

Entwicklung und Ausarbeitung
neuartiger ultrasensitiver Immunoassays
unter Verwendung der Biolumineszenz
des Leuchtkäfers „*Photinus pyralis*“

Werner Miska



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Entwicklung und Ausarbeitung neuartiger ultrasensitiver
Immunoassays unter Verwendung der Biolumineszenz
des Leuchtkäfers "Photinus pyralis"

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Werner Miska

München
Oktober 1986

1.Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Geiger

2.Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1986

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung.....	3
2. Einleitung.....	5
3. Aufgabenstellung.....	12
4. Material und Methoden.....	15
4.1. Material.....	15
4.2. Methoden.....	17
4.2.1. Gewinnung und Charakterisierung der Antiseren und Antikörper.....	17
4.2.2. Titerbestimmungen.....	19
4.2.3. Synthese und Charakterisierung der Luciferin-Derivate.....	21
4.2.4. Bestimmung der Enzymaktivitäten.....	24
4.2.5. Darstellung der Enzym-Antigen/Antikörper- Konjugate.....	28
4.2.5.1. Darstellung mittels der Glutardialdehyd- bzw. EDAPC-Methode.....	28
4.2.5.2. Darstellung mittels der SPDP ^R -Methode.....	29
4.2.6. Ultraviolett- und Fluoreszenzspektren.....	33
4.2.7. Enzymkinetische Messungen am Fluoreszenz- spektrophotometer.....	33
4.2.8. Messung von Hemmkinetiken.....	37
4.2.9. Elektrophoresen.....	38
4.2.10. Synthese chromatographischer Materialien.....	38
4.2.11. Chromatographische Verfahren.....	39
4.2.12. Luciferinbestimmung mittels Biolumineszenz.....	41
4.2.13. Detektionssysteme der Biolumineszenz- Enzymimmunoassays (BEIA).....	41
4.2.14. Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (BEIA).....	45
5. Ergebnisse.....	49
5.1. Luciferin-Derivate.....	49
5.1.1. Synthese der Luciferin-Derivate.....	49
5.1.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Luciferin-Derivate.....	52
5.1.3. Biochemische Eigenschaften der Luciferin- Derivate.....	56
5.2. Gewinnung von Antikörpern.....	59

5.3.	Darstellung von Enzym-Antigen/Antikörper-Konjugaten.....	60
5.4.	Biolumineszenz-Enzymimmunoassays.....	61
5.4.1.	Vorversuche.....	61
5.4.2.	Optimierung der Biolumineszenz-Enzymimmunoassays.....	62
5.4.2.1.	Bestimmung der optimalen Konzentration der Luciferin-Derivate in den Immunoassays.....	62
5.4.2.2.	Bestimmung der optimalen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen.....	64
5.4.3.	Durchführung der Biolumineszenz-Enzymimmunoassays.....	66
5.4.3.1.	Durchführung des BEIA mit Detektionssystem I (Konjugate mit Carboxylesterase).....	66
5.4.3.2.	Durchführung des BEIA mit Detektionssystem II (Konjugate mit Carboxypeptidase A).....	68
5.4.3.3.	Durchführung des BEIA mit Detektionssystem III (Konjugate mit Carboxypeptidase B).....	71
5.4.3.4.	Durchführung des BEIA mit Detektionssystem IV (Konjugate mit Arylsulfatase).....	73
5.4.3.5.	Durchführung des BEIA mit Detektionssystem V (Konjugate mit alkalischer Phosphatase).....	75
5.4.4.	Statistische Parameter.....	77
6.	Diskussion.....	79
7.	Ausblick.....	91
8.	Literaturverzeichnis.....	92
	Abkürzungen.....	95
	Danksagungen.....	96
	Lebenslauf.....	98

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung und Ausarbeitung neuartiger ultrasensitiver heterogener Immunoassays basierend auf der Biolumineszenz des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Dazu wurde ein neuartiges Detektionssystem entwickelt, das nach folgendem Prinzip aufgebaut ist: aus einem synthetischen Luciferin-Derivat (das Luciferin-Derivat wird von Luciferase selbst nicht unter Lichtemission umgesetzt) wird durch ein geeignetes Enzym (im Immunoassay mit Antigen bzw. Antikörper konjugiert) Luciferin freigesetzt, das mit Hilfe der Biolumineszenz-Reaktion quantifiziert wird.

Luciferin-methylester, Luciferyl-L-Phenylalanin, N^{α} -Luciferyl-L-Arginin, Luciferin-O-sulfat und Luciferin-O-phosphat wurden synthetisiert, charakterisiert und auf ihre Eignung geprüft. Dazu wurden deren kinetische Parameter K_M , V_{max} , k_{cat} und k_{cat}/K_M mit den entsprechenden Enzymen fluorimetrisch bestimmt. Bei allen fünf Luciferin-Derivaten wurde eine geringe Hemmung der Biolumineszenz-Reaktion festgestellt, die sich jedoch nicht im Biolumineszenzassay auswirkt.

Konjugate von Carboxylesterase, Carboxypeptidase A und B, Arylsulfatase und alkalischer Phosphatase mit Bradykinin, menschlichem Harnkallikrein (HUK), Anti-HUK bzw. Anti-Kaninchen-IgG wurden dargestellt, deren enzymatische Aktivitäten bestimmt und verschiedene Typen von Biolumineszenz-Enzymimmunoassays damit entwickelt. Die Inkubationsbedingungen wurden für alle Detektionssysteme optimiert.

Die Intra- bzw. Interassay-Koeffizienten des neuentwickelten heterogenen Immunoassays liegen im Bereich der bekannten Enzymimmunoassays. Die erreichbare Empfindlichkeit ist jedoch deutlich höher. So können mit Detektionssystem V

(Luciferin-O-phosphat / alkalische Phosphatase) noch 10^{-15} g menschliches Harnkallikrein pro Test nachgewiesen werden. Dies entspricht einer Grenzkonzentration von $5 \cdot 10^{-12}$ g.l⁻¹ an Harnkallikrein.

2. Einleitung.

Immunoassays

Seit Einführung der Immunoassays (Radioimmunoassay) vor über 20 Jahren durch Yalow & Berson (1) hat sich diese Methode als hervorragendes analytisches "Werkzeug" in der biochemischen Forschung und im Bereich der klinischen Routine erwiesen. Als allgemeines Prinzip liegt dem Immunoassay die sehr spezifische Bindung zwischen Antigen und Antikörper zu Grunde. Die Bindung von Antigen an Antikörper kann auf verschiedenste Weise detektiert werden (2). Die am häufigsten verwendeten Immunoassay-Techniken sind der Radioimmunoassay (RIA, 3) und der Enzymimmunoassay (EIA, 4). Beim RIA verwendet man radioaktive Isotope zur Markierung der Analyten. Radioaktivität läßt sich mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden sehr empfindlich nachweisen. Beim Enzymimmunoassay dienen Konjugate aus Analyt und Enzym als Marker, die Substrate in meist photometrisch detektierbare Produkte umwandeln können. Der Vorteil liegt hier u.a. in der Verstärkung des Signals durch das gekoppelte Enzym.

Radioimmunoassays werden am häufigsten als sogenannte "Kompetitions-Assays" (3) durchgeführt. Dabei konkurriert unmarkiertes Antigen mit radioaktiv markiertem Antigen (Tracer) um eine konstante Menge an Antikörper. Nach Trennung der freien von der an Antikörper gebundenen Radioaktivität wird entweder die freie oder die gebundene Radioaktivität bestimmt.

Eine weitere RIA-Technik, die Immunoradiometrie (4), basiert auf der Reaktion von Antigen mit radioaktiv markiertem Antikörper und anschließender Bestimmung der nichtgebundenen, markierten Antikörper.

Ferner finden sogenannte "Sandwich-Techniken" in einer Vielzahl von Ausführungen Anwendung (4).

Enzymimmunoassays werden in zwei grundsätzlich verschiedenen Techniken durchgeführt, dem homogenen EIA und dem heterogenen EIA.

Homogene Enzymimmunoassays zeichnen sich dadurch aus, daß nach der immunologischen Reaktion zwischen Marker, Antigen und Antikörper keine Trennung zwischen freiem und Antikörper-gebundenem Marker erfolgt. Durch die Bindung des Antigen-Enzym-Konjugates am Antikörper ändert sich durch sterische Hinderung die enzymatische Aktivität des Konjugates und ermöglicht dadurch die Quantifizierung des Antigens (4).

Assaysysteme, in denen die enzymatische Aktivität des Konjugates nicht durch die Bindung am Antikörper beeinflußt wird, benötigen wie der RIA eine Trennung von freier und an Antikörper gebundener enzymatischer Aktivität. Diese Trennung kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, wie z.B. mittels zweiter Antikörper- oder Polyethylenglykol-Präzipitation (4). Erfolgt die Trennung mittels Festphase, spricht man vom sogenannten ELISA (Enzym-Linked-Immunsorbent-Assay).

In kompetitiven Festphasen-Enzymimmunoassays (Abb.1A) konkurrieren Enzym-markiertes und unmarkiertes Antigen um die Bindungsstellen oberflächen-adsorbierter Antikörper. Gebundenes Antigen-Enzym-Konjugat wird nach Inkubation mit Substrat photometrisch detektiert.

Sogenannte Sandwich-Enzymimmunoassays werden in einer Vielzahl von Techniken durchgeführt (4). Einige Beispiele sind in Abbildung 1B - 1D dargestellt.

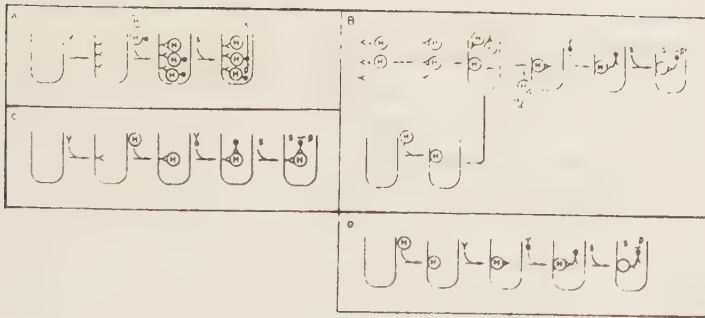


Abb. 1: Schematische Darstellung verschiedener Typen von Enzymimmunoassays. A, kompetitiver Festphasen-Enzymimmunoassay; B, "indirekter" ELISA; C, ELISA; D, Titerbestimmung mittels ELISA

Radioimmunoassays weisen eine Reihe von Nachteilen auf, wie z.B. Radiolyse der Tracer, kurze Haltbarkeit der Tracer (bedingt durch die kurzen Halbwertszeiten der eingesetzten Radionuklide), die Notwendigkeit für das Vorhandensein besonderer Räume sowie Schutzmaßnahmen für den Umgang mit Radionukliden, erhöhtes Gesundheitsrisiko für Personen und Umwelt u.a.m. Der RIA ist jedoch dem Enzymimmunoassay oft an Empfindlichkeit noch überlegen (4), und konnte aus diesem Grund bei verschiedenen Anwendungen nicht durch den EIA ersetzt werden.

Der homogene EIA ist im Vergleich zum heterogenen EIA deutlich weniger sensitiv.

Biolumineszenz

Die Biolumineszenz, die Emission von Licht durch biologische Systeme, fasziniert gleichermaßen Wissenschaftler wie Nichtwissenschaftler seit Jahrhunderten. Seit etwa Mitte des 17. Jahrhunderts wird die Biolumineszenz mit naturwissenschaftlichen Methoden untersucht. Dies führte zu dem heute recht umfangreichen Wissen über die Vorgänge, die

diesem Phänomen zu Grunde liegen.

Biolumineszenz ist bei Bakterien und Pilzen sowie bei niederen Tieren und Pflanzen ein weitverbreitetes Phänomen. Auch einige Insekten und Fische zeigen Biolumineszenz, jedoch keine höheren Pflanzen oder Vertebraten. Bei der biochemischen Reaktion, die für die Biolumineszenz verantwortlich ist, unterscheidet man drei wesentliche Komponenten. Zum einen die "Luciferase", ein Protein mit enzymatischen Eigenschaften, sodann "Luciferin", das Substrat der Luciferase, das bei der Reaktion mit Sauerstoff oder Peroxid unter Lichtemission zum sogenannten "Oxyluciferin" umgesetzt wird. Diese Modellvorstellung ist in groben Zügen fast einhundert Jahre alt. Sie erwies sich im folgenden als fruchtbare Grundlage für alle Forschungen auf diesem Gebiet. Eine Vielzahl von biolumineszenten Systemen - Luciferase plus entsprechendem Luciferin - konnte bisher in den vorgenannten Spezies entdeckt werden, in neuerer Zeit auch einige Systeme, die kein "Luciferin" zur Lichtemission benötigen. Eine detaillierte Übersicht über die bis heute bekannten biolumineszenten Systeme findet man bei Burr (5). Auf Grund der Vielfältigkeit biolumineszenter Systeme gibt es für eine Reihe von Parameter der Biolumineszenz-Reaktion Variationen. So findet man als "Luciferine" eine Vielzahl von chemischen Verbindungen, wie z.B. einfache längerketige Aldehyde (*Photobakterium fischeri* (7)), mehrkernige Heterocyclen (*Photinus pyralis*, Dinoflagellaten (7)) u.a. Auch physikalisch-chemische Parameter variieren in einem weiten Bereich, wie z.B. die Wellenlänge des emittierten Lichtes, die nahezu über den gesamten sichtbaren Spektralbereich variiert, oder die Quantenausbeute der Biolumineszenz-Reaktion (bezogen auf die Umsetzung von "Luciferin" zu "Oxyluciferin"), die Werte von 1% (*Latia neritoides* (8)) bis 90% (*Photinus pyralis* (6)) annehmen kann.

Photinus pyralis-Biolumineszenz

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das biolumineszente System des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* verwendet. Deshalb bezeichnen die im folgenden verwendeten Begriffe wie Luciferase, Luciferin und Oxyluciferin die Komponenten des biolumineszenten Systems des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Hierbei setzt Luciferase (ein Protein bestehend aus zwei Untereinheiten mit je 50.000 Dalton, (7)) Luciferin (eine heterocyclische Verbindung) mit Adenosin-triphosphat (ATP) und Sauerstoff um, zu Oxyluciferin (siehe Abb.2/V), CO_2 und Licht.

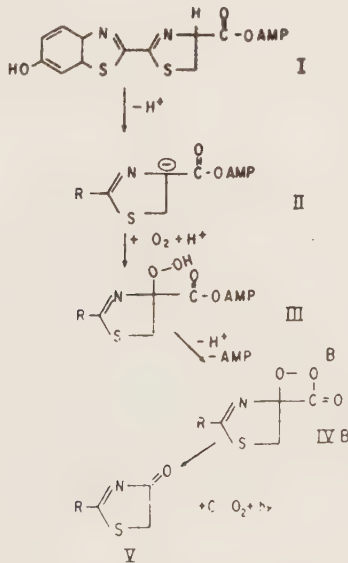


Abb. 2: Postulierter Mechanismus der Biolumineszenz-Reaktion des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*.

Am Anfang der heute allgemein anerkannten komplexen Reakti-

onssequenz (Abb.2) (9, 10) steht die "Aktivierung" von Luciferin mit $Mg \cdot ATP$ zu Luciferyl-Adenosinmonophosphat (Abb. 2/I). Diese erste Teilreaktion ist sehr spezifisch für ATP (11). Nach Deprotonierung am C4, Anlagerung von molekularem Sauerstoff und anschließender Umlagerung mit gleichzeitigem Austritt von AMP zum Cyclohexanon (Abb.2/IV), wird unter CO_2 -Abspaltung und Lichtemission Oxyluciferin (Abb.2/V) gebildet. Der entstandene Komplex aus Luciferase und Oxyluciferin dissoziiert unter in vitro-Bedingungen nicht (12). Das Maximum der Lichtemission liegt in vivo bei 560 nm (13). Das Emissionsspektrum dieser Biolumineszenz-Reaktion ist pH-abhängig und hat bei pH 7,5 das Maximum bei 560 nm, bei pH 6,5 das Maximum bei 620 nm (13). Die Quantenausbeute bezogen auf die Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin beträgt in vitro 90% (9) - die höchste bisher sowohl für Biolumineszenz als auch Chemilumineszenz bekannte.

Analytische Anwendungen der Biolumineszenz.

Assays, in denen die Biolumineszenz zur Detektion verwendet wird, sind äußerst sensitiv und daher zur Erfassung geringster Substanzmengen sehr gut geeignet. Vor über 30 Jahren beschrieben erstmals Strehler und Trotter (14) eine Methode zur quantitativen Bestimmung von ATP mit Hilfe des biolumineszenten Systems aus *Photinus pyralis*. Seitdem wurden auch andere biolumineszente Systeme für die Quantifizierung von Substanzen wie $NAD(P)H_2$, $FMNH_2$ u.a. verwendet (15). Die Verwendung gekoppelter enzymatischer Reaktionen erlaubt die Bestimmung einer Vielzahl biochemisch relevanter Verbindungen wie Ammoniak, Ethanol, Glucose, Glycerin etc. (15), aber auch von Enzymen wie z.B. Kreatinase, Lactatdehydrogenase u.v.a.m. (15).

Seit einigen Jahren werden auch Immunoassays entwickelt, die als Detektionssystem die Biolumineszenz verwenden.

Dabei wird Luciferase kovalent an Haptene gebunden und in einer Art kompetitivem ELISA eingesetzt (15). Auch "enzym-verstärkte" Lumineszenz-Immunoassays wurden entwickelt (16). Dazu wird ein ATP-produzierendes Enzym (Pyruvatkinase) mit Antigen konjugiert. Im anschließenden kompetitiven Immunoassay setzt das gekoppelte Enzym ADP in ATP um, das mit Hilfe der Biolumineszenz-Reaktion detektiert wird.

Biolumineszenz-Assays und Immunoassays, die zur Detektion des Analyten die Biolumineszenz verwenden, zeichnen sich durch eine Reihe von Vorzügen aus.

Sie besitzen eine extrem hohe Sensitivität, die im wesentlichen aus der Kombination dreier Faktoren resultiert: (a) die hohe Quantenausbeute der Biolumineszenz (abhängig vom verwendeten System bis zu 90% (6)), (b) relativ schnelle enzymatische Reaktionen und (c) sensitive Meßsysteme, wie z.B. Luminometer. So können z.B. noch 10^{-16} mol Adenosin-triphosphat mittels Biolumineszenz nachgewiesen werden (17).

Ein weiterer Vorteil liegt in der Linearität des Meßsignals über einen großen Bereich, der vier bis sieben Zehnerpotenzen überstreichen kann.

Des weiteren besitzen Biolumineszenz-Reaktionen eine hohe Spezifität in Bezug auf ihre Cofaktoren, wie z.B. ATP im biolumineszenten System von *Photinus pyralis* (11).

Und schließlich sind im Gegensatz zum Radioimmunoassay die möglichen Gefahren deutlich geringer, da die benötigten Reagenzien nicht radioaktiv und zudem meist biologisch leicht abbaubare Stoffe sind (15).

3. Aufgabenstellung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein neuartiges, ultrasensitives Detektionssystem für heterogene Immunoassays auszuarbeiten, das einerseits nicht die Nachteile des Radioimmunoassays hat und andererseits eine mindestens vergleichbare Sensitivität besitzt.

Die Lösung des Problems sollte mit einem auf der Biolumineszenz basierenden Detektionssystem gefunden werden. Eine Kombination von Biolumineszenz mit einer vorgeschalteten enzymatischen Reaktion (zur Verstärkung des Biolumineszenz-Signals) sollte ein ultrasensitives Nachweisverfahren ermöglichen. Wegen des relativ einfach und sehr empfindlich zu messenden Lichtes, das während der Biolumineszenz-Reaktion emittiert wird, eignet sich die Biolumineszenz gut für ein solch sensitives Detektionssystem. Das biolumineszente System des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* ist wegen seiner hohen Quantenausbeute (in vitro ca. 1 (6), d.h. nahezu aus jedem Luciferinmolekül wird ein Lichtquant freigesetzt) besonders geeignet. Luciferin, eine der Komponenten dieses Systems, kann damit sehr empfindlich bestimmt werden (19). Eine zusätzliche Steigerung der Empfindlichkeit des angestrebten Nachweisverfahrens sollte durch eine geeignete enzymatische Reaktion, die Luciferin aus einem Luciferin-Derivat freisetzt, ermöglicht werden. Das Prinzip des neuartigen Detektionssystems sollte folgendermaßen aussehen: aus einem Luciferin-Derivat (das von Luciferase nicht unter Lichtemission umgesetzt wird) wird durch ein geeignetes Enzym (im Immunoassay mit Antigen bzw. Antikörper konjugiert) Luciferin freigesetzt, das mit Hilfe der Biolumineszenz-Reaktion quantifiziert werden kann (Abb.3).

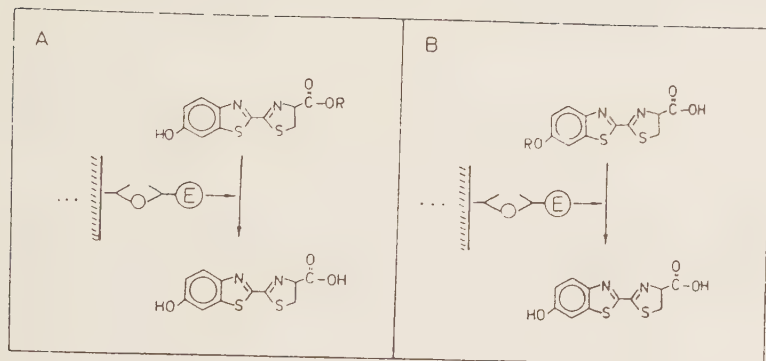


Abb. 3: Prinzip des neuartigen Detektionssystems.

D(-)-Luciferin (D(-)-2-(6'-Hydroxy-2'-Benzothiazolyl)- Δ^2 -Thiazolin-4-Carbonsäure) enthält zwei funktionelle Gruppen, eine Carboxylgruppe und eine phenolische OH-Gruppe, die sich beide für Derivatisierungen anbieten. Derivate der Carboxylgruppe und der phenolischen OH-Gruppe waren deshalb darzustellen, zu charakterisieren und auf ihre Eignung zu prüfen. Dazu sollten Parameter wie K_M , V_{max} , k_{cat} , k_{cat}/K_M und eine mögliche Hemmung der Biolumineszenz-Reaktion ermittelt werden.

Zur Etablierung des neuen Detektionssystems war es weiterhin notwendig, geeignete Antikörper für die geplanten Immunoassays zu gewinnen.

Ferner mußten Antigen- bzw. Antikörper-Enzym-Konjugate verschiedenster Zusammensetzung dargestellt und gereinigt werden. Des weiteren mußten ihre enzymatische Aktivität und ihre immunologische Reaktivität überprüft werden.

Nach Klärung der grundsätzlichen Fragestellungen mußten die Immunoassays mit Biolumineszenz-Detektionssystem optimiert werden (Konzentration der Luciferin-Derivate, Inkubationszeiten, Inkubationstemperatur und Inkubationspuffer).

Ferner mußten statistische Parameter und die Empfindlichkeit ermittelt werden.

4. Material und Methoden

4.1. Material

Synthetisches Luciferin (*Photinus pyralis*) wurde von der Fa. Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen bezogen. N,N'-Dicyclo-carbodiimid und N-Ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid waren Produkte der Fluka AG, Buchs, Schweiz. SPDP^R N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat war ein Produkt der Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden.

Pansorbin A^R wurde von der Fa. Calbiochem, LaJolla, USA geliefert. Komplettes Freund'sches Adjuvants und Agarose waren Produkte der Behringwerke AG, Marburg. Bradykinin war ein Produkt der Fa. Novabiochem AG, Läfelfingen, Schweiz. L-Aminosäuren, Pyridin-SO₃- Komplex, POCl₃, Glutardialdehyd und Lösungsmittel sowie alle übrigen Substanzen wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

Alle verwendeten Substanzen waren entweder "p.A." oder "biochemisch rein".

Materialien für die Chromatographie: Sephadex G-15, G-25, G-150, Cyanbromid-aktivierte Sepharose sowie die FPLC-Fertigsäule Mono Q waren Produkte der Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Schweden. Bio-Gel P-2 wurde von der Fa. Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA bezogen. Kieselgel 60, Cellulose- und Kieselgel 60-Dünnschichtplatten, sowie die HPLC-Fertigsäule Hibar EC RP-8 waren Produkte der Fa. Merck, Darmstadt.

Substrate: AcPheArgOEt war ein Produkt der Fa. Novabiochem AG, Läfelfingen, Schweiz. ATP und NAD wurden von der Fa. Merck, Darmstadt bezogen. p-Nitrophenylacetat, Hippuryl-

(L)-Phenylalanin, Hippuryl-(L)-Arginin, p-Nitrophenylsulfat und p-Nitrophenylphosphat waren Produkte der Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen.

Enzyme: Carboxylesterase, Carboxypeptidase A und B, Arylsulfatase und alkalische Phosphatase wurden von der Sigma Chemie GmbH, Taufkirchen bezogen. Arylsulfatase wurde über FPLC noch nachgereinigt (siehe 4.2.11.). Luciferase (Photinus pyralis) und Alkoholdehydrogenase waren Produkte der Fa. Boehringer, Mannheim. Menschliches Harnkallikrein wurde von Dr. R. Geiger zur Verfügung gestellt.

Antikörper: Antikörper gegen Bradykinin wurden von der Fa. Paesel, Frankfurt geliefert. Immunselektierte Anti-Kaninchen-Immunglobuline von der Ziege wurden von Miles-Yeda Ltd, Rehovot, Israel bezogen.

4.2. Methoden

4.2.1. Gewinnung und Charakterisierung der Antiseren und Antikörper

Immunisierung der Kaninchen.

2 ml HUK-Lösung (300 ug in 2 ml NaCl-Lösung (9 g/l)) wurden mit 2 ml kompletten Freund'schem Adjuvants emulgiert. Die Emulsion wurde vier weiblichen Neuseeländer-Kaninchen (75ug HUK pro Tier) intracutan injiziert. Zwei Wochen nach der Grundimmunisierung wurden sechs Wochen lang jede Woche Boosterinjektionen intravenös gegeben (pro Tier 100 ug HUK in 1 ml NaCl-Lösung (9 g/l)). Der Antikörpertiter wurde wöchentlich mittels ELISA kontrolliert. Anschließend wurden die Tiere entblutet und die Seren gewonnen (50-70 ml pro Tier).

Immunisierung der Ziege.

1 mg menschliches Harnkallikrein (HUK) in 0,5 ml NaCl-Lösung (9 g/l) gelöst wurde mit 0,5 ml kompletten Freund'schem Adjuvants emulgiert und einer Ziege intracutan injiziert (Gewicht des Tieres ca. 40 kg). Zwei Wochen nach der Grundimmunisierung verabreichte man intravenös drei Wochen lang jede Woche 100 ug HUK in 1 ml NaCl-Lösung (9 g/l). Der Titer wurde jede Woche mittels ELISA kontrolliert. Anschließend entnahm man aus einer Halsvene 100-150 ml Blut und gewann daraus Serum.

Isolierung der Gesamt-IgG-Fraktion aus Kaninchen-Seren.

Die Isolierung wurde nach Steinbuch (20) durchgeführt.

Isolierung spezifischer Antikörper gegen menschliches Harnkallikrein aus Kaninchenseren.

Zur Isolierung der spezifischen Antikörper wurden 30 ml Serum bei 4°C auf eine HUK-Sephrose-Säule (20x10 cm) aufgetragen und über Nacht zyklisch gepumpt (Fluß: 20 ml/h). Anschließend wusch man die Säule bei gleicher Pumpgeschwindigkeit 24 h mit Phosphat-Puffer (25 mmol/l Kaliumphosphat, 1 mol/l NaCl, pH 7,0). Die gebundenen Antikörper wurden mit 150 ml 4 mol/l Natriumthiocyanat in Phosphat-Puffer eluiert und gegen 5 x 10 l NaCl-Lösung (9 g/l) dialysiert. Die erhaltene Antikörperlösung wurde durch einen Filter (Millipore, 0,22 µm) sterilfiltriert und in Portionen zu 2 ml in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Charakterisierung der Antiseren.

Antiseren wurden durch deren Antikörpertiter (Definition siehe 4.2.2.) charakterisiert.

Charakterisierung der Antikörper.

Die Reinheitsbestimmung der Antikörper erfolgte mittels Immunelektrophorese (siehe 4.2.9.).

4.2.2. Titerbestimmungen.

Puffer .

Puffer A: 15 mmol/l Natriumcarbonat, 0,35 mol/l Natriumhydrogencarbonat, 0,2 g/l Natriumazid, pH 9,6

Puffer B: 10 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat, 15 mmol/l Natriumchlorid, 0,05 g/l Tween 20, pH 7,4

Puffer C: 1,5 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat, 10 mmol/l di-Natriumhydrogenphosphat, 0,14 mol/l Natrium-chlorid, 0,5 g/l Tween 20, 2 mg/ml Rinderserumalbumin, pH 7,4

Puffer D: 0,1 mol/l Citronensäure, 0,1 mol/l Kaliumdihydrogenphosphat, pH 4,5

Titerbestimmung in Kaninchen-Seren.

Mikrotiterplatten (Fa. Dynatech, Denkendorf) wurden über Nacht mit menschlichem Harnkallikrein (10 ug/ml Puffer A; 0,2 ml pro Kavität) beschichtet. Anschließend wusch man die Platten fünfmal mit Puffer B, pipettierte unterschiedliche Mengen an Anti-HUK-Serum (10-0,001 ul in 0,2ml Puffer C) in die Kavitäten und inkubierte 3h bei 37°C. Nach erneutem Waschen mit Puffer B inkubierte man 2 h mit Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (1:2000 verdünnt in Puffer C), wusch fünfmal mit Puffer B und gab die Substratlösung (1 mg/ml ABTS, 0,1 mmol/l Wasserstoffperoxid in Puffer D) zu. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen. Ein relatives Maß für den Antikörpertiter war das Volumen des eingesetzten Serums, bei dem die halbmaximal meßbare Extinktion von 0,75 erreicht wurde.

Titerbestimmung in Ziegen-Serum.

Die Titerbestimmung in Ziegen-Serum wurde analog der Bestimmung in Kaninchen-Serum durchgeführt; statt des Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugates wurde ein Anti-Schaf-IgG-Peroxidase-Konjugat eingesetzt.

Titerbestimmung mit Pansorbin A^R.

Eine konstante Menge menschlichen Harnkallikreins wurde zur Präzipitation mit unterschiedlichen Mengen an Antikörpern inkubiert. Nach Komplexierung mit Pansorbin A^R konnte das Antikörper-gebundene HUK durch Abzentrifugieren aus der Lösung von nicht gebundenem HUK entfernt werden. Im Überstand noch vorhandenes HUK wurde durch Spaltung von AcPheArgOEt bestimmt.

Ansatz :

0,02 ml HUK-Lösung (20 µg/ml)
0,10 ml Antikörper-Lösung in 75 mmol/l Natrium-
pyrophosphat, 75 mmol/l Semicarbazid-
hydrochlorid, 23 mmol/l Glycin, pH 8,7

1 h bei 37°C inkubieren

0,10 ml 100 g/l Pansorbin A^R

1 h bei 37°C inkubieren

Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert und die enzymatische Aktivität des menschlichen Harnkallikreins im Überstand bestimmt (vgl. 4.2.4.). Nach graphischer Auftra-

gung der Aktivität ($\Delta E/\text{min}$) gegen die Serum-Verdünnung ergab sich beim extrapolierten Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse der sog. Äquivalenzpunkt, der ein Maß für den Anti-HUK-Titer des Serums ist.

4.2.3. Synthese und Charakterisierung der Luciferin-Derivate

Luciferinmethylester.

Luciferinmethylester wurde nach E.H.White et al. (10) dargestellt.

Um Spuren von Luciferin zu entfernen, erfolgte eine weitere Reinigung des Esters über eine Kieselgelsäule (10x2 cm, Kieselgel 60; 0,040-0,063 mm; Merck). Eluiert wurde mit einem Gemisch aus Benzol/Ethylacetat im Verhältnis 1:1 (v/v).

Ausbeute: 69% d.Th.

$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$ MG: 294,35

Elementar-Analyse: C ber.48,97% H ber.3,42% N ber.9,52%
C gef.49,59% H gef.3,77% N gef.9,41%

Luciferin-N-hydroxysuccinimidester.

Zu 30 mg (0,11 mmol) Luciferin und 12 mg (0,11 mmol) N-Hydroxysuccinimid in 1,8 ml Tetrahydrofuran gab man 25 mg (0,12 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 0,1ml Tetrahydrofuran und ließ lichtgeschützt 3h bei Raumtemperatur stehen. Der ausgefallene Harnstoff wurde abfiltriert und das Filtrat zu 21 ml n-Hexan gegeben. Der entstandene flockige Niederschlag wurde abgesaugt und im Exsikkator über KOH ge-

trocknet.

Ausbeute: 33 mg entspr. 80% d.Th.

$C_{15}H_{11}N_3O_5S_2$ MG: 377,397

Elementar-Analyse(mit 1/4 n-Hexan):

C ber.49,68% H ber.3,66% N ber.10,53%

C gef.49,39% H gef.3,77% N gef.10,56%

Luciferyl-(L)-Phenylalanin.

10 mg (25 umol) Luciferin-N-hydroxysuccinimidester wurden zu einer Lösung von 4,5 mg (27 umol) L-Phenylalanin und 6 ul Triethylamin in 0,3 ml 600 g/l Dioxan gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 2 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend gab man 1,0 ml verd. Essigsäure zu und ließ in der Kälte über Nacht stehen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, in wenig verd. Ammoniak aufgenommen und mittels HPLC-System I (siehe 4.2.11.) weiter gereinigt.

Ausbeute: 6,52 mg entspr. 63% d.Th.

$C_{20}H_{17}N_3O_4S_2$ MG: 402,49

N^{α} -Luciferyl-(L)-Arginin.

12 mg (30 umol) Luciferin-N-hydroxysuccinimidester wurden mit 0,3 ml Dioxan und mit 0,2 ml einer 0,6 mol/l (0,12 mmol) L-Arginin-Lösung, pH 7,5 versetzt. Der pH wurde mit 2 N NaOH auf pH 6 eingestellt und der Reaktionsansatz 2 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurde im Vakuum eingeeengt, der Rückstand in verd. Ammoniak aufgenommen und über HPLC-System II (siehe 4.2.11.) gereinigt.

Ausbeute: 4,81 mg entspr. 37% d.Th.

$C_{17}H_{20}N_6O_4S_2$ MG: 436,52

Luciferin-O-sulfat.

20 mg (71 μmol) Luciferin wurden in 0,6 ml trockenem Pyridin gelöst und zu 16 mg (100 μmol) Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex gegeben. Man ließ 2 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt stehen. Danach wurde im Vakuum eingeengt, der Rückstand in wenig verd. Ammoniak aufgenommen und über HPLC-System III (siehe 4.2.11.) gereinigt.

Ausbeute: 10,2 mg entspr. 36% d.Th.

$\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_3$ MG: 360,39

Luciferin-O-phosphat.

50 mg (0,18 mmol) Luciferin wurden in einer Suspension von 350 mg Magnesiumoxid in 3 ml H_2O aufgelöst. Zu der gekühlten Suspension tropfte man langsam eine Lösung von 92 mg (0,6 mmol) Phosphoroxychlorid in 1 ml Tetrachlorkohlenstoff. Anschließend ließ man 30 min bei Raumtemperatur stehen, filtrierte und neutralisierte das Filtrat mit Essigsäure. Nach Einengen im Vakuum wurde über HPLC-System III (siehe 4.2.11.) gereinigt.

Ausbeute: 21,5 mg entspr. 29% d.Th.

$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2\text{P}$ MG: 359,39

4.2.4. Bestimmung der Enzymaktivitäten

Bestimmung der enzymatischen Aktivität von menschlichem Harnkallikrein (EC 3.4.21.35)

Bei der Spaltung von AcPheArgOEt durch menschliches Harnkallikrein (HUK) wird Ethanol freigesetzt, das über eine gekoppelte enzymatische Reaktion mit Alkoholdehydrogenase (ADH) bei 366 nm photometrisch bestimmt werden kann.

Ansatz :

1,00 ml 75 mmol/l Natriumpyrophosphat,
75 mmol/l Semicarbazid-
hydrochlorid, 23 mmol/l Glycin,
pH 8,7

0,05 ml AcPheArgOEt (6,77 mg/ml)

0,05 ml NAD (20,44 mg/ml)

0,01 ml ADH-Suspension (30 mg/ml)

(0,39-x) ml H₂O

5 min bei 25°C inkubieren

x ml HUK-Lösung ($x \leq 0,39$ ml)

Eine Extinktionsänderung von $\Delta E_{\text{min}} = 2,93$ ($\epsilon_{366} = 3,44 \times 10^3$ M⁻¹cm⁻¹ (28)) entspricht 1 Einheit (U) HUK.

Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Carboxylesterase (EC 3.1.1.1)

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Carboxylesterase wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz :

0,10 ml 0,5 mol/l Tris/HCl, pH 8,0
0,88 ml 1 mmol/l p-Nitrophenylacetat

5 min vorinkubieren bei 25°C

0,02 ml Enzymlösung

Eine Extinktionsänderung von $\Delta E/\text{min} = 18,5$ ($\epsilon_{405} = 18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (21)) entspricht 1 U Carboxylesterase.

Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1)

Die enzymatische Aktivität der Carboxypeptidase A wurde mit folgendem Ansatz bestimmt:

Ansatz :

0,10 ml 0,5 mol/l Tris/HCl,
1 mol/l NaCl, pH 7,5
0,10 ml 10 mmol/l Hippuryl-(L)-Phenylalanin
0,78 ml H₂O

5 min vorinkubieren bei 37°C

0,02 ml Enzymlösung in LiCl-Lsg. (100 g/l)

1 U Carboxypeptidase A entspricht einer Extinktionsänderung von $\Delta E/\text{min} = 0,36$ ($\epsilon_{254} = 360 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (21)).

Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2)

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Carboxypeptidase B wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz :

0,48 ml 50 mmol/l Tris/HCl, 0,2 mol/l NaCl
pH 7,8

0,50 ml 2 mmol/l Hippuryl-(L)-Arginin

5 min vorinkubieren bei 37°C

0,02 ml Enzymlösung

Eine Extinktionsänderung von $\Delta E/\text{min} = 0,349$ ($\epsilon_{254} = 349 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (21)) entspricht 1 U Carboxypeptidase B.

Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Arylsulfatase (EC 3.1.6.1)

Arylsulfatase hydrolisiert im Sauren p-Nitrophenylsulfat zu Sulfat und p-Nitrophenol. Letzteres läßt sich im Alkalischen photometrisch bei 405 nm bestimmen.

Ansatz :

0,43 ml 0,2 mol/l Natriumacetat,
0,5 mol/l NaCl, pH 5,0
0,50 ml 2 mmol/l p-Nitrophenylsulfat

5 min vorinkubieren bei 25°C

0,02 ml Enzymlösung

5 min inkubieren (25°C)

0,05 ml 2N NaOH

Nach Subtraktion der Extinktion vor Zugabe des Enzyms vom Meßwert und Division durch die Inkubationszeit erhält man die enzymatische Aktivität. 1 U Arylsulfatase entspricht einem $\Delta E/\text{min}$ von 18,5. ($\epsilon_{405} = 18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (21)).

Bestimmung der enzymatischen Aktivität von alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1)

Der Umsatz von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol durch alkalische Phosphatase läßt sich bei 405 nm photometrisch verfolgen .

Ansatz :

0,48 ml 0,1 mol/l Diethanolamin,
1 mmol/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 9,8
0,50 ml 20 mmol/l p-Nitrophenylphosphat

5 min vorinkubieren bei 25°C

0,02 ml Enzymlösung

Eine Extinktionsänderung von $\Delta E/\text{min} = 18,5$ ($\epsilon_{405} = 18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (21)) entspricht 1 U alkalischer Phosphatase.

Bei allen enzymatischen Reaktionen wurde ein Leerwert mitbestimmt, in dem die Enzym-Lösung durch den jeweiligen Puffer ersetzt wurde.

4.2.5. Darstellung der Enzym-Antigen/Antikörper-Konjugate

4.2.5.1. Darstellung mittels der Glutardialdehyd- bzw. EDAPC-Methode

Darstellung eines Anti-Kaninchen-IgG-Carboxylesterase-Konjugats.

Zu 400 μg immunselektierten Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege und 500 μg Carboxylesterase in 0,15 ml Phosphat-Puffer (0,1 mol/l Natriumphosphat, 0,25 mol/l NaCl pH 7,2) gab man 0,015 ml Glutardialdehyd (25 g/l) und inkubierte 1 h bei 25°C. Anschließend reinigte man gelchromatographisch an Sephadex G-150 in Phosphat-Puffer. Das Konjugat wurde mit dem Ausschlußvolumen eluiert.

Darstellung eines Bradykinin-Carboxylesterase-Konjugats.

320 μg Bradykinin und 850 μg Carboxylesterase in 0,25 ml Phosphat-Puffer (0,1 mol/l Natriumphosphat, 0,25 mol/l NaCl pH 7,2) wurden mit 4 mg N-Ethyl-N'-(3-Diethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid in 20 μl Wasser versetzt und 1 h

bei 0°C inkubiert. Die niedermolekularen Reaktionsprodukte trennte man gelchromatographisch an Sephadex G-15 in Phosphat-Puffer ab. Das Konjugat wurde mit dem Ausschlußvolumen eluiert.

Darstellung eines HUK-Carboxylesterase Konjugats.

Zu 60 µg HUK und 850 µg Carboxylesterase in 0,15 ml Phosphat-Puffer (0,1 mol/l Natriumphosphat, 0,25 mol/l NaCl pH 7,2) gab man 15 µl 25 g/l Glutardialdehyd und inkubierte 1 h bei 25°C. Anschließend reinigte man gelchromatographisch an Sephadex G-150 in Phosphat-Puffer. Das Konjugat wurde mit dem Ausschlußvolumen eluiert.

4.2.5.2. Darstellung mittels der SPDP^R-Methode

Thiopyridyl- und Thiopropyl-Komponente wurden in verschiedenen molaren Verhältnissen (siehe Tab. 1) in Phosphat-Puffer (0,1 mol/l Natriumphosphat, 0,25 mol/l NaCl pH 7,5) 18 h bei 4°C inkubiert. Die Abtrennung von niedermolekularen Reaktionsprodukten erfolgte über Gelchromatographie an Sephadex G-25 in Phosphat-Puffer.

Die Bestimmung der Thiopropyl- und Thiopyridylgruppen erfolgte nach Carlsson et al. (22)

Der Proteingehalt wurde nach Bradford (23) bestimmt.

Tab. 1: Bei den Konjugat-Synthesen eingesetzte molaren Verhältnisse.

Thiopropylkomponente	Thiopyridylkomponente	molares Verhältnis Thiopropyl- zu Thiopyridylkomponente
Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)	CarboxypeptidaseA	1:3
"-	CarboxypeptidaseB	1:3
"-	Arylsulfatase	1:3
"-	alkal.Phosphatase	1:4
Anti-HUK-IgG	CarboxypeptidaseA	1:4
"-	CarboxypeptidaseB	1:4
"-	alkal.Phosphatase	1:4
Bradykinin	CarboxypeptidaseA	5:1
"-	CarboxypeptidaseB	5:1
"-	Arylsulfatase	5:1
"-	alkal.Phosphatase	5:1
HUK	CarboxypeptidaseA	1:3
"-	CarboxypeptidaseB	1:3

Synthese der Thiopropylkomponenten.

Puffer.

Puffer I : 0,1 mol/l di-Natriumhydrogenphosphat,
0,25 mol/l Natriumchlorid pH 7,5

Puffer II: 0,1 mol/l Natriumacetat, 0,25 mol/l Natriumchlorid pH 4,5

Darstellung von 'Thiopropyl-Anti-Kaninchen-IgG'.

a) 'Thiopyridyl-Anti-Kaninchen-IgG'.

4,5 mg immunselektierte Anti-Kaninchen-IgG von der Ziege in 1 ml Puffer I wurden mit 31 μ g SPDP^R in 10 μ l Ethanol versetzt und 30 min bei 25°C inkubiert. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte an Sephadex G-25 in Puffer II.

b) Reduktion zur Thiopropylverbindung.

2 ml 'Thiopyridyl-Anti-Kaninchen-IgG' (1,3 mg/ml Protein, Puffer II) wurden mit 0,1 ml 1 mol/l DTT-Lösung 20 min bei 25°C reduziert. Die niedermolekularen Reaktionsprodukte wurden an Sephadex G-25 in Puffer I abgetrennt.

Darstellung von 'Thiopropyl-Anti-HUK-IgG'.

Die Synthese von 'Thiopropyl-Anti-HUK-IgG' erfolgte analog der Synthese von 'Thiopropyl-Anti-Kaninchen-IgG'.

Darstellung von 'Thiopropyl-Bradykinin'.

1 mg Bradykinin in 0,2 ml Puffer I versetzte man mit 0,6 mg SPDP^R in 0,1 ml Ethanol und inkubierte 30 min bei 25°C. Danach gab man 0,1 ml 1 mol/l DTT-Lösung zu und inkubierte weitere 20 min bei 25°C. Anschließend trennte man niedermolekulare Reaktionsprodukte an einer Bio-Gel P-2 Säule in Puffer I ab.

Darstellung von 'Thiopropyl-HUK'.

a) 'Thiopyridyl-HUK'.

1 mg menschliches Harnkallikrein in 0,2 ml Puffer I wurden mit 10 μg SPDP^R in 0,02 ml Ethanol 30 min bei 25°C inkubiert. Danach reinigte man an Sephadex G-25 in Puffer II.

b) Reduktion zu 'Thiopropyl-HUK'.

1 ml 'Thiopyridyl-HUK'-Lösung (0,3 mg Protein pro ml, Puffer II) versetzte man mit 0,05 ml 1 mol/l DTT und inkubierte 20 min bei 25°C. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte an Sephadex G-25 in Puffer I.

Darstellung der Thiopyridyl-Komponenten von Arylsulfatase, alkalischer Phosphatase und den Carboxypeptidasen A und B.

0,1 μmol des Enzyms in 1 ml Puffer I wurden mit 160 μg SPDP^R in 0,02 ml Ethanol versetzt und 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte an Sephadex G-25 in Puffer I.

4.2.6. Ultraviolett- und Fluoreszenzspektren.

Ultraviolett-Spektren

Spektren im sichtbaren und ultravioletten Bereich wurden am Zeiss PMQ3 Spektralphotometer bei Raumtemperatur in 5 nm-Schritten aufgenommen.

Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren wurden am Hitachi 650-40 Fluoreszenzspektrophotometer bei Raumtemperatur gemessen.

4.2.7. Enzymkinetische Messungen am Fluoreszenzspektrophotometer.

Bestimmung der K_M und V_{max} von Carboxylesterase (EC 3.1.1.1.) für das Substrat Luciferinmethylester.

Luciferinmethylester wurde durch Carboxylesterase zu Luciferin und Methanol hydrolysiert. Diese Reaktion läßt sich durch die Abnahme der Fluoreszenz bei $\lambda_{EX} = 330 \text{ nm}$ und $\lambda_{EM} = 541 \text{ nm}$ verfolgen.

Ansatz :

(1-x) ml 50 mmol/l Tris/HCl pH 7,5
x ml 1 mmol/l Luciferinmethylester
in Tris-Puffer ($x \leq 0,5 \text{ ml}$)

5 min bei 37°C vorinkubieren

0,02 ml Enzymlösung (0,04 mg/ml)

Die Bestimmung von K_M und V_{max} erfolgte nach Lineweaver-Burk (24) durch Darstellung der zeitlichen Änderung der relativen Fluoreszenz pro Minute gegen die Substrat-Konzentration.

Bestimmung der K_M und V_{max} von Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1.) für das Substrat Luciferyl-(L)-Phenylalanin.

Carboxypeptidase A setzt Luciferyl-(L)-Phenylalanin zu Luciferin und (L)-Phenylalanin um. Dieser Umsatz kann durch die Abnahme der Fluoreszenz bei $\lambda_{Ex} = 332 \text{ nm}$ und $\lambda_{Em} = 543 \text{ nm}$ gemessen werden.

Ansatz :

(1-x)	ml 50 mmol/l Tris/HCl, 1 mol/l NaCl
	pH 7,5
x	ml 1 mmol/l Luciferyl-(L)-Phenyl-
	alanin in Puffer ($x \leq 0,5 \text{ ml}$)

5 min bei 37°C vorinkubieren

0,03 ml Enzymlösung (1,5 mg/ml)

Zur Bestimmung von K_M und V_{max} wurde die zeitliche Änderung der relativen Fluoreszenz pro Minute gegen die Luciferyl-(L)-Phenylalanin-Konzentration nach Lineweaver-Burk (24) aufgetragen.

Bestimmung der K_M und V_{max} von Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2.) für das Substrat N^α -Luciferyl-(L)-Arginin.

Carboxypeptidase B hydrolisiert N^α -Luciferyl-(L)-Arginin zu Luciferin und (L)-Arginin. Diese Reaktion läßt sich durch die Abnahme der Fluoreszenz bei $\lambda_{Ex} = 333 \text{ nm}$ und $\lambda_{Em} = 544 \text{ nm}$ verfolgen.

Ansatz :

(1-x) ml 25 mmol/l Tris/HCl, 0,1 mol/l NaCl
pH 7,8

x ml 1 mmol/l N^α -Luciferyl-(L)-Arginin
in Puffer ($x \leq 0,5 \text{ ml}$)

5 min bei 37°C vorinkubieren

0,03 ml Enzymlösung (0,2 mg/ml)

K_M und V_{max} wurden graphisch nach Lineweaver-Burk (24), durch Auftragung der zeitlichen Änderung der relativen Fluoreszenz pro Minute gegen die Substrat-Konzentration ermittelt.

Bestimmung der K_M und V_{max} von Arylsulfatase (EC 3.1.6.1.) für das Substrat Luciferin-O-sulfat.

Luciferin-O-sulfat wird durch Arylsulfatase zu Luciferin und Sulfat hydrolisiert. Die Reaktion läßt sich durch die Abnahme der Fluoreszenz bei $\lambda_{Ex} = 308 \text{ nm}$ und $\lambda_{Em} = 412 \text{ nm}$ verfolgen .

Ansatz :

(1-x) ml 0,1 mol/l Natriumacetat, 0,25 mol/l
NaCl pH 5,0

x ml 1 mmol/l Luciferin-O-sulfat
in Puffer ($x \leq 0,5$ ml)

5 min bei 37°C vorinkubieren

0,01 ml Enzymlösung (2,0 mg/ml)

Die Bestimmung von K_M und V_{max} erfolgte nach Lineweaver-Burk (24) durch graphische Darstellung der zeitlichen Änderung der relativen Fluoreszenz pro Minute gegen die Luciferin-O-sulfat-Konzentration.

Bestimmung der K_M und V_{max} von alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1.) für das Substrat Luciferin-O-phosphat.

Alkalische Phosphatase hydrolisiert Luciferin-O-phosphat zu Luciferin und Phosphat. Diese Reaktion läßt sich durch die Zunahme der Fluoreszenz bei $\lambda_{Ex} = 383$ nm und $\lambda_{Em} = 530$ nm verfolgen.

Ansatz :

(1-x) ml 50 mmol/l Diethanolamin, 1 mmol/l
 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ pH 9,8

x ml 1 mmol/l Luciferin-O-phosphat
in Puffer ($x \leq 0,5$ ml)

5 min bei 37°C vorinkubieren

0,02 ml Enzymlösung (250 ng/ml)

K_M und V_{max} wurden durch Auftragung der zeitlichen Änderung der relativen Fluoreszenz pro Minute nach Lineweaver-Burk (24) gegen die Substrat-Konzentration ermittelt.

4.2.8. Messung von Hemmkinetiken.

Bei der Umsetzung von Luciferin, ATP und Sauerstoff durch Luciferase wird Licht emittiert. Durch Derivate des Luciferins wie Luciferinmethylester, Luciferyl-(L)-Aminosäuren, Luciferin-O-sulfat bzw. Luciferin-O-phosphat kann diese Lichtemission gehemmt werden. Die Hemmung der Lichtemission durch Luciferin-Derivate wurde mit folgendem Ansatz ermittelt:

Ansatz :

0,40 ml 30 mmol/l HEPES, 6,6 mmol/l
MgCl₂, 0,66 mmol/l EDTA,
0,1 mmol/l DTT, 5 mmol/l ATP,
1 ug Luciferase (8 mU/mg) pH 7,75

5 min bei 25°C inkubieren

0,05 ml Luciferin-Lösung
0,05 ml Luciferin-Derivat-Lösung

Nach 10 sec wurde das emittierte Licht gemessen. Die Änderung der Lichtemission in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Luciferinderivates ist ein Maß für dessen Hemmung der Luciferase. Als Leerwert diente ein Ansatz mit Puffer an Stelle des Luciferin-Derivats.

4.2.9. Elektrophoresen.

Immunelektrophorese.

Zur Durchführung von Immunelektrophoresen wurden Agarose-Gele (10 g/l Agarose in 43 mmol/l 5,5-Diethylbarbiturat, 43 mmol/l Natriumacetat, pH 8,2; 10x10 cm) gegossen; 5-10 μ l der IgG-Lösung wurden aufgetragen und 2 h bei 150 V unter Wasserkühlung elektrophoriert. Anschließend legte man parallel zur Elektrophoreserichtung einen Antiserumkanal frei, füllte mit Antiserum auf und ließ 18 h in einer feuchten Kammer diffundieren. Danach wurden die Gele entwässert, mit physiologischer Kochsalzlösung und dest. Wasser gewaschen, mit Coomassie Blue (5 g/l in verd. Ethanol (450 ml/l H₂O)) angefärbt und mit einer Lösung aus Ethanol, dest. Wasser, Eisessig (50:50:11) entfärbt.

4.2.10. Synthese von chromatographischen Materialien.

Synthese eines HUK-Affinitätsgeles.

5 g CNBr-aktivierte Sepharose wurden in 50 ml 1 mmol/l HCl 15 min bei Raumtemperatur gequollen. Anschließend wusch man mit 300 ml 1 mmol/l HCl und 20 ml H₂O. Danach inkubierte man das Gel in einer Lösung von 10 mg menschlichem Harnkalikrein in 25 ml Carbonat-Puffer (0,1 mol/l Natriumhydrogencarbonat, 0,5 mol/l Natriumchlorid pH 8,3) 3 h unter leichtem Schütteln. Man wusch das Gel anschließend mit 300 ml Carbonat-Puffer, suspendierte in 25 ml 1 mol/l Ethanol-

amin pH 8,1 und inkubierte 2 h unter leichtem Schütteln. Danach wusch man das fertige Affinitätsgel mit 500 ml Carbonat-Puffer, überführte in eine Säule und äquillibrierte mit Phosphat-Puffer (25 mmol/l di-Kaliumhydrogenphosphat, 1 mol/l Natriumchlorid, 0,2 g/l Natriumazid pH 7,0).

4.2.11. Chromatographische Verfahren.

Dünnschicht-Chromatographie.

Dünnschicht-Chromatographien auf Kieselgel und Cellulose wurden nach White et al. (25) durchgeführt.

Gelfiltration.

Die bei der Synthese der Antigen/Antikörper-Enzym-Konjugate notwendigen Gelfiltrationen (Sephadex G-15, G-25, G-150) wurden nach Vorschriften der Fa. Pharmacia (vgl. Firmenschrift "Gel filtration theory and practice") durchgeführt.

HPLC-Systeme.

Alle Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographien wurden Hewlett Packard 1080 durchgeführt.

System I :

Säule : Hibar EC RP-8, 250x4 mm (Fa. Merck)

Lösung A : 0,05 mol/l Ammoniumacetat pH 8,0

Lösung B : Methanol zur Chromatographie

Mischung : 58% B

Fluß : 1 ml/min

Detektion: 350 nm

System II :

Säule : Hibar EC RP-8, 250x4 mm (Fa. Merck)
Lösung A : 0,05 mol/l Ammoniumacetat pH 8,0
Lösung B : Methanol zur Chromatographie
Mischung : 50% B
Fluß : 1 ml/min
Detektion: 350 nm

System III:

Säule : Hibar EC RP-8, 250x4 mm (Fa. Merck)
Lösung A : 0,05 mol/l Ammoniumacetat pH 6,5
Lösung B : Methanol zur Chromatographie
Mischung : 35% B
Fluß : 1 ml/min
Detektion: 350 nm

FPLC-System zur Reinigung der Arylsulfatase (EC 3.1.6.1.).

Für die "Fast Protein Liquid Chromatography" wurde ein Gerät von der Firma Pharmacia verwendet.

Säule : Anionenaustauscher Mono Q (Pharmacia)
Puffer A : 0,05 mol/l Diethanolamin pH 9,5
Puffer B : 0,05 mol/l Diethanolamin,
1 mol/l NaCl pH 9,5
Fluß : 1 ml/min
Detektion: 214 nm
Programm : 0-5 min 0% Puffer B
5-10 min Gradient von 0 bis 50% Puffer B

4.2.12. Luciferinbestimmung mittels Biolumineszenz.

Bei der Umsetzung von Luciferin, ATP und Sauerstoff durch Luciferase wird Licht emittiert. Zur Bestimmung der Lichtemission wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz :

0,4 ml 50 mmol/l HEPES, 6,6 mmol/l
MgCl₂, 0,66 mmol/l EDTA,
0,1 mmol/l DTT, 5 mmol/l ATP, 1 µg
Luciferase (8 mU/mg) pH 7,75 (bei
25°C vortemperiert)

1 min bei 25°C
(im Biolumimeter inkubieren)

0,1 ml Luciferin-Lösung bzw.
BEIA-Probe (vgl. 4.2.13.)

Nach 10 sec wurde das emittierte Licht gemessen. Mit Hilfe einer Eichgerade kann Luciferin quantifiziert werden. Als Leerwert diene ein Ansatz mit dem entsprechenden Puffer an Stelle von Luciferin.

4.2.13. Detektionssysteme der Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (BEIA).

Die in den Immunoassays spezifisch gebundenen Antigen- bzw. Antikörper-Enzym-Konjugate setzen aus den jeweiligen Luciferin-Derivaten Luciferin frei, das anschließend bioluminometrisch quantifiziert wird. Bei den in den Antigen- bzw. Antikörper-Enzym-Konjugaten verwendeten Enzymen handelt es

sich dabei um Carboxylesterase, Carboxypeptidase A und B, Arylsulfatase bzw. alkalische Phosphatase.

Detektionssystem I (Antigen bzw. Antikörper-Konjugate mit Carboxylesterase (EC 3.1.1.1))

Um das gebundene Carboxylesterase-Konjugat zu bestimmen, wurde folgender Ansatz pipettiert:

Ansatz (pro Mikrotiterplatten-Kavität):

0,2 ml Luciferinmethylester-Lösung
(2 $\mu\text{mol/l}$ in 0,05 mol/l
Tris/HCl pH 7,5)

1 h bei 37°C inkubieren

0,1 ml Reaktionslösung entnehmen und
freigesetztes Luciferin mittels
Biolumineszenzassay (siehe 4.2.12.)
quantifizieren.

Detektionssystem II (Antigen bzw. Antikörper-Konjugate mit Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1))

Um das gebundene Carboxypeptidase A-Konjugat zu bestimmen, wurde folgender Ansatz pipettiert:

Ansatz (pro Mikrotiterplatten-Kavität):

0,2 ml Luciferyl-(L)-Phenylalanin-Lösung
(10 $\mu\text{mol/l}$ in 0,05 mol/l
Tris/HCl, 3 g/l LiCl pH 7,5)

1 h bei 37°C inkubieren

0,1 ml Reaktionslösung entnehmen und
freigesetztes Luciferin mittels
Biolumineszenzassay (siehe 4.2.12.)
quantifizieren.

Detektionssystem III (Antigen bzw. Antikörper-Konjugate mit
Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2))

Um das gebundene Carboxypeptidase B-Konjugat zu bestimmen,
wurde folgender Ansatz pipettiert:

Ansatz (pro Mikrotiterplatten-Kavität):

0,2 ml N ^{α} -Luciferyl-(L)-Arginin-Lösung
(10 $\mu\text{mol/l}$ in 0,05 mol/l
Tris/HCl, 0,2 mol/l NaCl pH 7,8)

1 h bei 37°C inkubieren

0,1 ml Reaktionslösung entnehmen und
freigesetztes Luciferin mittels
Biolumineszenzassay (siehe 4.2.12.)
quantifizieren.

Detektionssystem IV (Antigen bzw. Antikörper-Konjugate mit Arylsulfatase (EC 3.1.6.1))

Um das gebundene Arylsulfatase-Konjugat zu bestimmen, wurde folgender Ansatz pipettiert:

Ansatz (pro Mikrotiterplatten-Kavität):

0,2 ml Luciferin-O-sulfat-Lösung
(10 $\mu\text{mol/l}$ in 10 mmol/l
Natriumacetat pH 5,0)

1 h bei 37°C inkubieren

0,1 ml Reaktionslösung entnehmen und
freigesetztes Luciferin mittels
Biolumineszenzassay (siehe 4.2.12.)
quantifizieren.

Detektionssystem V (Antigen bzw. Antikörper-Konjugate mit alkalischer Phosphatase (EC 3.1.3.1))

Um das gebundene alkal. Phosphatase-Konjugat zu bestimmen, wurde folgender Ansatz pipettiert:

Ansatz (pro Mikrotiterplatten-Kavität):

0,2 ml Luciferin-O-phosphat-Lösung
(10 $\mu\text{mol/l}$ in 10 mmol/l
Diethanolamin, 0,5 mmol/l
 MgCl_2 pH 9,8)

1 h bei 37°C inkubieren

0,1 ml Reaktionslösung entnehmen und
freigesetztes Luciferin mittels
Biolumineszenzassay (siehe 4.2.12.)
quantifizieren.

4.2.14. Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (BEIA).

Puffer.

Puffer A bis C sind mit den Puffern von 4.2.2. identisch.

Beschichtung der Mikrotiterplatten für Optimierungsexperimente (5.4.2.1. und 5.4.2.2.).

Mikrotiterplatten (Fa. Dynatech, Denkendorf) wurden über Nacht mit menschlichem Harnkallikrein (10 $\mu\text{g/ml}$ Puffer A; 0,2 ml pro Kavität) inkubiert. Anschließend wusch man die Platten fünfmal mit Puffer B, pipettierte 0,2 ml einer Lösung von Anti-HUK-IgG-Enzym*-Konjugat (in Puffer C) in die

*vgl. Fußnote Seite 48

Kavitäten und inkubierte 3h bei 37°C. Nach erneutem Waschen mit Puffer B konnten die Mikrotiterplatten für die unter 5.4.2. beschriebenen Optimierungsexperimente eingesetzt werden.

Titerbestimmung.

Die Bestimmung des Titors von Antiseren mittels Biolumineszenz-Enzymimmunoassay wurde analog des in 4.2.2. beschriebenen Immunoassays durchgeführt. Statt des dort verwendeten Detektionssystems mit Peroxidase verwendet man beim Biolumineszenz-Enzymimmunoassay die Detektionssysteme I bis V (siehe 4.2.13).

Kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für Bradykinin.

Mikrotiterplatten (Fa. Dynatech) wurden über Nacht mit immunselektierten Anti-Bradykinin-IgG (10 ug/ml in Puffer A; 0,2 ml/Kavität) inkubiert. Anschließend wusch man die Platten fünfmal mit Puffer B, pipettierte 0,15 ml einer Bradykinin-Lösung (in Puffer C) und 0,05 ml einer Bradykinin-Enzym*-Konjugat-Lösung in die Kavitäten und inkubierte 24 h bei 4°C. Nach erneutem Waschen mit Puffer B konnte das gebundene Bradykinin-Enzym-Konjugat mit den Detektionssystemen I bis V quantifiziert werden (siehe 4.2.13.).

*vgl. Fußnote Seite 48

Kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein.

Mikrotiterplatten (Fa. Dynatech) wurden über Nacht mit immunselektierten Anti-HUK-IgG (10 ug/ml in Puffer A; 0,2 ml/Kavität) inkubiert. Anschließend wusch man die Platten fünfmal mit Puffer B, pipettierte 0,15 ml einer Lösung von menschlichem Harnkallikrein (in Puffer C) und 0,05 ml einer HUK-Enzym*-Konjugat-Lösung in die Kavitäten und inkubierte 24 h bei 40°C. Nach erneutem Waschen mit Puffer B konnte das gebundene HUK-Enzym-Konjugat mit den Detektionssystemen I bis III bestimmt werden (4.2.13.).

Sandwich-Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein.

Mikrotiterplatten (Fa. Dynatech) wurden über Nacht mit immunselektierten Anti-HUK-IgG vom Kaninchen (10 ug/ml Puffer A; 0,2 ml/Kavität) inkubiert. Anschließend wusch man die Platten fünfmal mit Puffer B, pipettierte 0,2 ml einer Lösung von menschlichem Harnkallikrein (in Puffer C) in die Kavitäten und inkubierte 24 h bei 40°C. Nach erneutem Waschen mit Puffer B inkubierte man 24 h mit Anti-HUK-IgG-Enzym-Konjugat (10 ug/ml Puffer C). Anschließend wurden die Mikrotiter-Platten erneut gewaschen. Zur Bestimmung des gebundenen Anti-HUK-IgG-Enzym*-Konjugats konnten die Detektionssysteme II, III und V verwendet werden (vgl. 4.2.13.).

*vgl. Fußnote Seite 48

Indirekter Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein.

Mikrotiterplatten (Fa. Dynatech) wurden über Nacht mit HUK (10 ug/ml Puffer A; 0,2 ml pro Kavität) inkubiert. Parallel dazu wurden je 0,5 ml einer Anti-HUK-Lösung (100 pg/ml spez. IgG in Puffer C) mit je 0,5 ml einer HUK-Lösung (0,01-10 pg/ml HUK in Puffer C) bei 4°C inkubiert. Anschließend wusch man die Mikrotiterplatten fünfmal mit Puffer B, pipettierte die Inkubationslösungen (0,2 ml pro Kavität) in die Kavitäten und inkubierte 5 h bei 37°C. Nach erneutem Waschen mit Puffer B inkubierte man 24 h mit Anti-Kaninchen-IgG-Enzym*-Konjugat (0,2 ml in Puffer C) und wusch mit Puffer B. Zur Bestimmung des gebundenen Anti-Kaninchen-IgG-Enzym-Konjugats konnten die Detektionssysteme I bis V verwendet werden (siehe 4.2.13.)

* In Abhängigkeit vom Detektionssystem (I bis V) fanden folgende Enzyme Verwendung: Carboxylesterase, Carboxypeptidase A und B, Arylsulfatase und alkalische Phosphatase.

5. Ergebnisse

5.1. Luciferin-Derivate.

5.1.1. Synthese der Luciferin-Derivate.

Die als Enzym-Substrate verwendeten Luciferin-Derivate sind in Tab. 2 dargestellt. Einen schematischen Überblick über die einzelnen Syntheserouten zeigt Abb. 4. Die Darstellung der Derivate wurde wie unter 4.2.3. beschrieben durchgeführt.

Tab. 2: Synthetisierte Luciferin-Derivate.
Angaben der Ausbeuten nach Reinigung.

Luciferin-Derivate	Ausbeute
Luciferinmethylester	69 %
Luciferyl-(L)-Phenylalanin	63 %
N ^α -Luciferyl-(L)-Arginin	37 %
Luciferin-O-sulfat	36 %
Luciferin-O-phosphat	29 %

Luciferinmethylester wurde mittels Säulen-Chromatographie an Kieselgel 60 gereinigt. Die weiteren Luciferin-Derivate wurden mit Hilfe der hochauflösenden Flüssigkeits-Chromato-

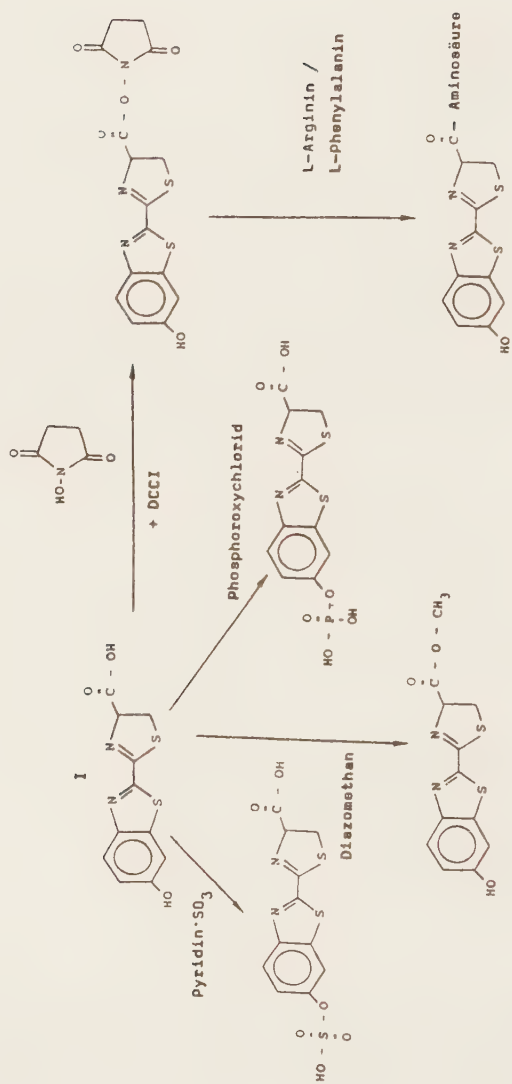
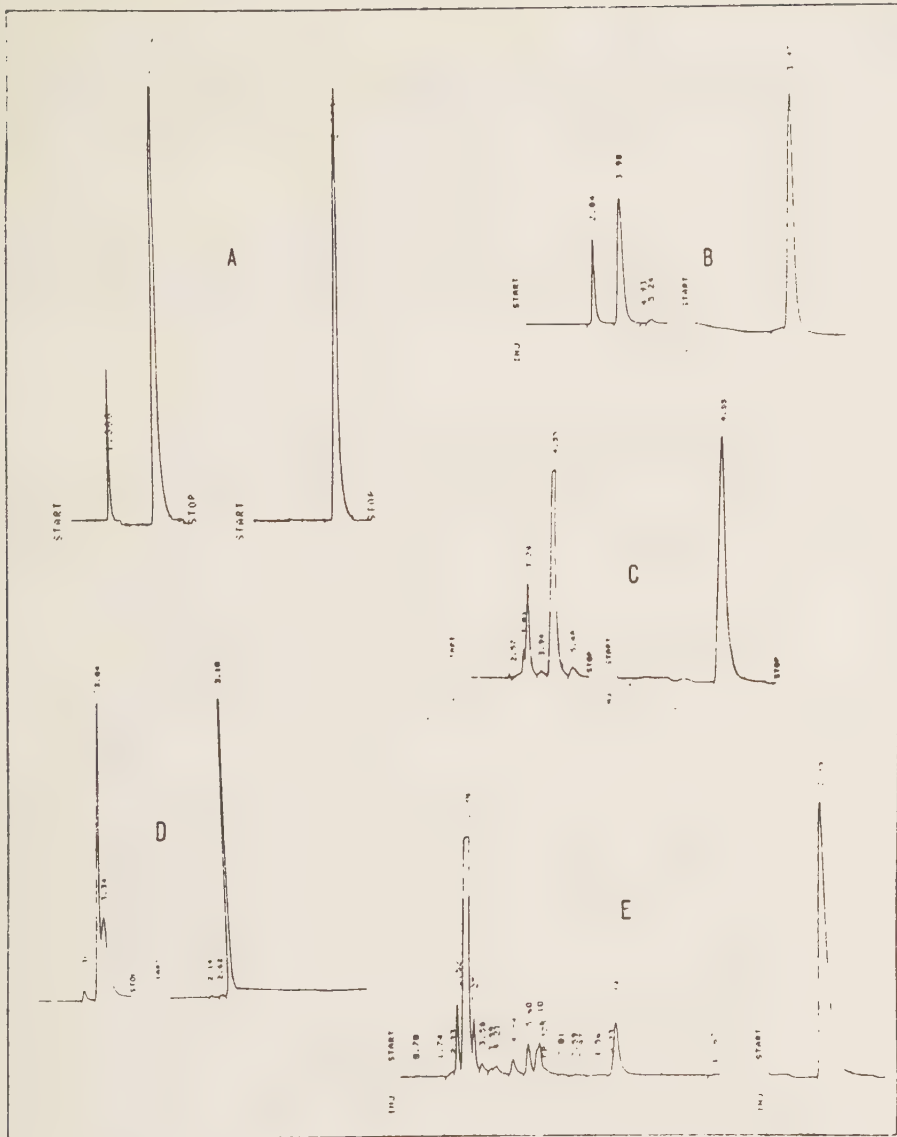


Abb. 4: Schema der Luciferin-Derivat-Synthesen



graphie (HPLC) gereinigt (verwendete Systeme siehe 4.2.3.). Die erhaltenen Verbindungen waren in der DC und HPLC einheitlich (Abb. 5).

5.1.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Luciferin-Derivate.

Ultraviolett- und Fluoreszenzspektren

Die Maxima der UV-Spektren der Luciferin-Derivate sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: UV-Maxima der dargestellten Luciferin-Derivate.

Luciferin-Derivat	Lösungsmittel	Maxima (nm)
Luciferin	Methanol	269, 332
Luciferinmethylester	Methanol	269, 328
Luciferyl-(L)-Phenylalanin	0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,5	270, 335
N ^α -Luciferyl-(L)-Arginin	0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,5	265, 335
Luciferin-O-sulfat	0,1 mol/l Natriumacetat, pH 5,0	250, 290
Luciferin-O-phosphat	0,05 mol/l Diethanolamin, pH 9,8	260, 315

Im UV-Spektrum der Luciferin-Derivate zeigt sich bei den Derivaten der OH-Gruppe insbesondere beim langwelligeren

Maximum eine deutliche Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen.

Abb. 6 zeigt die Fluoreszenzspektren der Luciferin-Derivate.

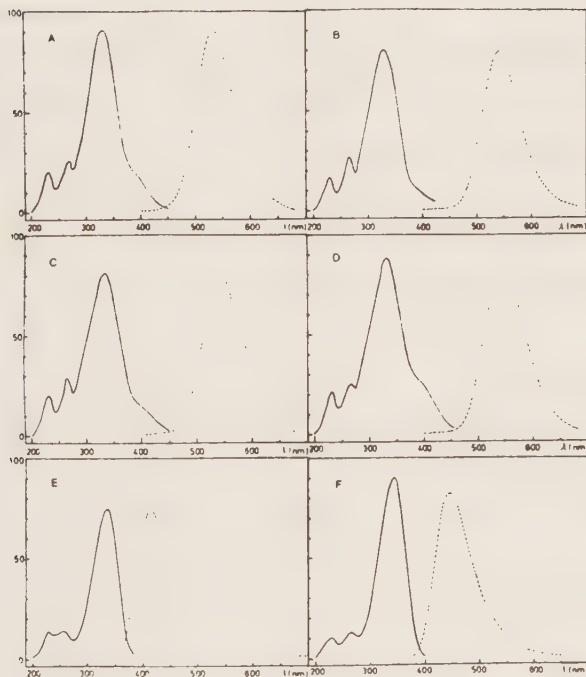


Abb. 6: Fluoreszenz-Spektren von Luciferin (A), Luciferinmethylester (B), Luciferyl-(L)-Phenylalanin (C), N^α-Luciferyl-(L)-Arginin (D), Luciferin-O-sulfat (E) und Luciferin-O-phosphat (F).

Die Luciferin-Derivate der Carboxylgruppe (Luciferinmethylester, Luciferyl-(L)-Phenylalanin und N^α-Luciferyl-(L)-Arginin) zeigen wie Luciferin (7) im Alkalischen eine starke Fluoreszenz im Bereich von 530-535 nm. Im Gegensatz dazu zeigen die Derivate der OH-Gruppe eine nur geringe und um bis zu 100 nm zu niedrigeren Wellenlängen hin verschobene Fluoreszenz (Abb. 6).

FAB-Massenspektren

Die FAB-Massenspektrometrie der Luciferin-Derivate ergab die für sie charakteristischen m/z-Werte (Tab. 4).

Tab. 4: m/z-Werte der FAB-Massenspektren der Luciferin-Derivate.

Luciferin-Derivate	FG ^{*)}	MH ⁺ (m/z)
Luciferinmethylester	294,4	295
Luciferyl-(L)-Phenylalanin	427,6	428
N ^α -Luciferyl-(L)-Arginin	436,5	437
Luciferin-O-sulfat	360,4	361
Luciferin-O-phosphat	359,4	360

*) FG: Formelgewicht.

Zur chemischen Charakterisierung der Luciferin-Derivate wurden deren Luciferingehalte nach vollständiger Hydrolyse mit den entsprechenden Enzymen mit Hilfe der Biolumineszenz ermittelt (Tab. 5). Die nach der Freisetzung von Luciferin aus den Luciferin-Derivaten erhaltenen Fluoreszenzspektren

waren mit dem des Luciferins identisch (vgl. Abb. 6A).

Tab. 5: Luminometrisch bestimmter Gehalt an Luciferin in Luciferin-Derivaten.

Luciferin-Derivat	spaltendes Enzym*)	Luciferin-gehalt (%)	
		ber.	gef.
Luciferinmethylester	Carboxylesterase	89,5	89,4
Luciferyl-(L)-Phenylalanin	Carboxypeptidase A	61,6	61,3
N ^α -Luciferyl-(L)-Arginin	Carboxypeptidase B	60,3	60,5
Luciferin-O-sulfat	Arylsulfatase	73,1	72,4
Luciferin-O-phosphat	alkalische Phosphatase	73,3	73,0

*) Die enzymatischen Spaltungen wurden mit einem Enzymüberschuß unter Bedingungen wie unter 4.2.7. beschrieben durchgeführt.

Zur weiteren Charakterisierung von Luciferyl-(L)-Phenylalanin und N^α-Luciferyl-(L)-Arginin wurden deren Aminosäurenanteile nach Hydrolyse in 6 N HCl (18 h bei 110°C) mittels Aminosäurenanalyse bestimmt.

Luciferyl-(L)-Phenylalanin enthält 37,9 % Phenylalanin (theoretischer Wert: 38,4 %); N^α-Luciferyl-(L)-Arginin enthält 38,7 % Arginin (theoretischer Wert: 39,7 %)

5.1.3. Biochemische Eigenschaften der Luciferin-Derivate.

Zur Beurteilung der Verwendbarkeit der synthetisierten Luciferin-Derivate im Detektionssystem der Enzymimmunoassays wurden kinetische Konstanten bestimmt. In Tab. 6 sind die Werte für die Konstanten K_M , V_{max} , k_{cat} und k_{cat}/K_M der verwendeten Enzyme mit dem jeweiligen Luciferin-Derivat als Substrat aufgeführt.

Die Verringerung der Lichtausbeute bei der Biolumineszenz-Reaktion (Umsatz von Luciferin durch Luciferase unter Lichtemission) durch Luciferin-Derivate wurde wie unter 4.2.8. beschrieben gemessen. Dabei wurden für die einzelnen Luciferin-Derivate Konzentrationen von 10^{-6} , 10^{-5} und 10^{-4} mol/l eingesetzt und die Luciferin-Konzentration im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-10} mol/l variiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 wiedergegeben.

Tab. 6: Kinetische Daten. Bedingungen siehe 4.2.7.

Enzym	Luciferin-Derivat	K_M ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)	V_{max}^* ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Carboxylesterase	Luciferinmethylester	$1,6 \cdot 10^{-5}$	11	11	660
Carboxypeptidase A	Luciferyl-(L)-Phenylalanin	$3,5 \cdot 10^{-3}$	14	7,7	2,2
Carboxypeptidase B	N^α -Luciferyl-(L)-Arginin	$2,0 \cdot 10^{-4}$	12	7,0	35
Arylsulfatase	Luciferin-O-sulfat	$7,1 \cdot 10^{-5}$	6,4 ⁺	-	---
alkalische Phosphatase	Luciferin-O-phosphat	$4,3 \cdot 10^{-5}$	610	1000	23.000

*) Die Angaben zur spezifischen Aktivität der Enzyme wurden vom Hersteller nach Überprüfung übernommen.

+) Proteinbestimmung nach Reinigung über FPLC erfolgte nach Bradford (23).

Tab. 7: Prozentuale Lichtausbeute der Biolumineszenz-Reaktion in Gegenwart von Luciferin-Derivat. Bedingungen siehe 4.2.8.

Luciferin-Derivat	Konz. (mol/l)	Luciferin-Konzentration		
		10^{-9} (mol/l)	10^{-8} (mol/l)	10^{-7} (mol/l)
Kontrolle	0	100	100	100
Luciferinmethylester	10^{-7}	—	80	96
	10^{-6}	—	34	40
	10^{-5}	—	24	2
Luciferyl-(L)-Phenylalanin	10^{-6}	100	96	71
	10^{-5}	80	78	65
	10^{-4}	40	66	31
N ^α -Luciferyl-(L)-Arginin	10^{-6}	—	80	73
	10^{-5}	—	92	71
	10^{-4}	—	61	58
Luciferin-O-sulfat	10^{-6}	100	96	73
	10^{-5}	100	89	55
	10^{-4}	100	100	52
Luciferin-O-phosphat	10^{-6}	100	100	80
	10^{-5}	100	100	69
	10^{-4}	—	46	59

Alle untersuchten Luciferin-Derivate können je nach eingesetzter Konzentration die Lichtausbeute der Biolumineszenz-Reaktion verringern.

5.2. Gewinnung von Antikörpern.

Die Bildung von Antikörpern gegen menschliches Harnkallikrein wurde während der Immunisierung mittels Enzymimmunoassay verfolgt. Nach ca. sechs Wochen war ein genügend hoher Antikörper-Titer erreicht, so daß die Tiere entblutet werden konnten.

Zur Gewinnung monospezifischer Antikörper gegen menschliches Harnkallikrein wurden die Antiseren immunaffinitätschromatographisch gereinigt (siehe 4.2.1.).

Zur Charakterisierung der gewonnenen Antikörper wurden Immunelektrophoresen angefertigt (Abb. 7).

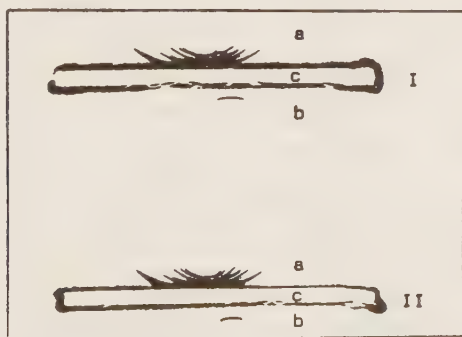


Abb. 7: Immunelektrophoresen von monospezifischen Anti-HUK-Immunglobulinen G vom Kaninchen (Ib), Anti-HUK-Immunglobulin G-Fraktion nach Steinbuch vom Kaninchen (IIb) und Kaninchen-Vollserum (Ia und IIa). Ic und IIc enthielten Anti-Kaninchenserum von der Ziege.

5.3. Darstellung von Enzym-Antigen/Antikörper-Konjugaten

In Tab. 8 sind alle in der Arbeit dargestellten Enzym-Antigen-Konjugate bzw. Enzym-Antikörper-Konjugate aufgeführt.

Tab. 8: Übersicht der Darstellung und enzymatischen Aktivität von Antigen- bzw. Antikörper-Enzym-Konjugaten.

Enzym	Antigen/Antikörper	Darst.-Methode +)	Enzym. Aktivität (U/ml) *)
Carboxylesterase	Bradykinin	EDAPC	5,8
-"-	HUK	GDA	7,2
-"-	Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)	GDA	0,62
-"-	Anti-HUK-IgG	GDA	0,37
CarboxypeptidaseA	Bradykinin	SPDP ^R	29
-"-	HUK	SPDP ^R	21
-"-	Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)	SPDP ^R	6,5
-"-	Anti-HUK-IgG	SPDP ^R	25
CarboxypeptidaseB	Bradykinin	SPDP ^R	35
-"-	HUK	SPDP ^R	29
-"-	Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)	SPDP ^R	3,5
-"-	Anti-HUK-IgG	SPDP ^R	31
Arylsulfatase	Bradykinin	SPDP ^R	1,7
-"-	Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)	SPDP ^R	1,5
alkal. Phosphatase	Bradykinin	SPDP ^R	120
-"-	Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)	SPDP ^R	210
-"-	Anti-HUK-IgG	SPDP ^R	220

+) Detaillierte Beschreibung der Darstellung vgl. 4.2.5.

*) Enzymatische Aktivitäten wurden wie unter 4.2.4. beschrieben bestimmt.

5.4. Biolumineszenz-Enzymimmunoassays.

5.4.1. Vorversuche.

Eine zentrale Fragestellung der Arbeit war, ob das aus Vorstufen freigesetzte Luciferin mit Hilfe des biolumineszenten Systems von *Photinus pyralis* quantifiziert werden konnte. Abb. 8 zeigt die Lichtausbeute in Abhängigkeit von der Luciferin-Konzentration im Biolumineszenzassay.

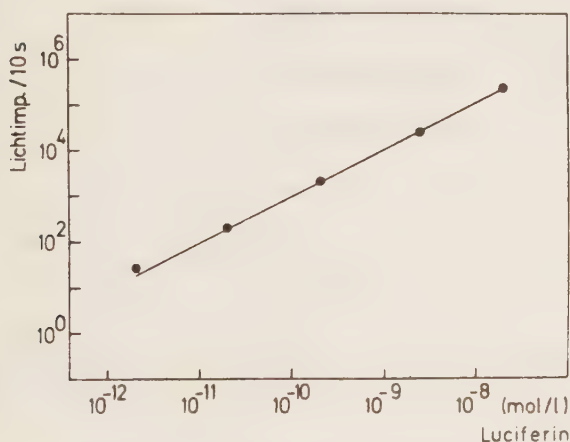


Abb. 8: Lichtemission der Biolumineszenz-Reaktion in Abhängigkeit von eingesetzter Luciferin-Konzentration.

Zum Nachweis der Spaltung der synthetisierten Luciferin-Derivate durch die entsprechenden Enzyme wurden folgende Vorversuche durchgeführt. Mikro-Syntheseansätze der einzelnen Luciferin-Derivate wurden mittels Dünnschichtchromatographie gereinigt, mit dem entsprechenden Enzym 10 min

bei 25°C inkubiert und anschließend auf freigesetztes Luciferin im Biolumineszenzassay getestet. Als Leerwert diente ein Ansatz ohne Enzym. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 9 zusammengestellt.

Tab. 9: Vorversuch zur Spaltbarkeit der Luciferin-Derivate.

Luciferin-Derivat	Enzym	Lichtausbeute (Imp/sec) nach Inkubation	
		ohne Enzym	mit Enzym
Luciferinmethyl- ester	Carboxylesterase	950	14.000
Luciferyl-(L)- Phenylalanin	Carboxypeptidase A	720	1.400
N ⁶ -Luciferyl-(L)- Arginin	Carboxypeptidase B	540	4.400
Luciferin-O- sulfat	Arylsulfatase	860	13.000
Luciferin-O- phosphat	alkal. Phosphatase	750	42.000

5.4.2. Optimierung des Biolumineszenz-Enzymimmunoassays.

5.4.2.1. Bestimmung der optimalen Konzentrationen der Luciferin-Derivate in den Immunoassays.

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration der Luciferin-Derivate im Test wurden über Kaninchen-IgG gebundenes Anti-Kaninchen-IgG-Enzym-Konjugat mit unterschiedlichen Konzentrationen an Luciferin-Derivat inkubiert. Abb. 9A bis 9E zeigen die Ergebnisse für die verschiedenen Luciferin-Derivate.

vate.

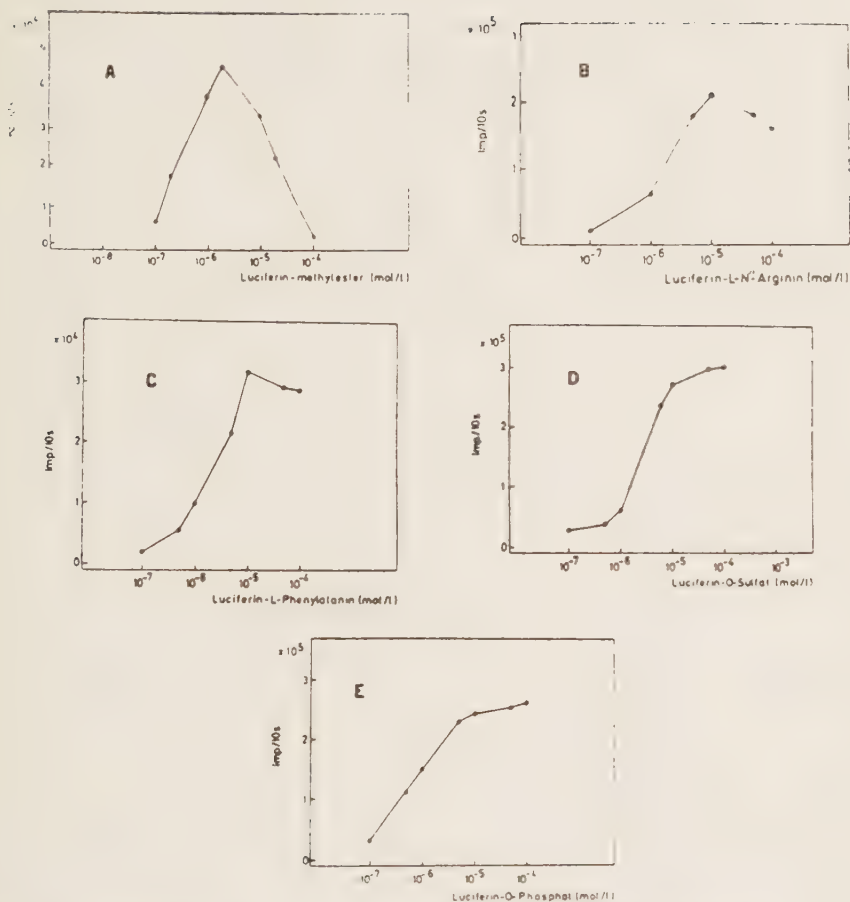


Abb. 9: Bestimmung der optimalen Konzentration an Luciferin-Derivat in den Detektionssystemen I bis V (A - E). Bedingungen siehe 4.2.14.

5.4.2.2. Bestimmung der optimalen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen.

Um die optimalen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen für die Freisetzung von Luciferin aus den einzelnen Luciferin-Derivaten zu ermitteln, wurden an Festphase gebundene Anti-Kaninchen-IgG-Enzym-Konjugate (vgl. 5.4.2.1.)

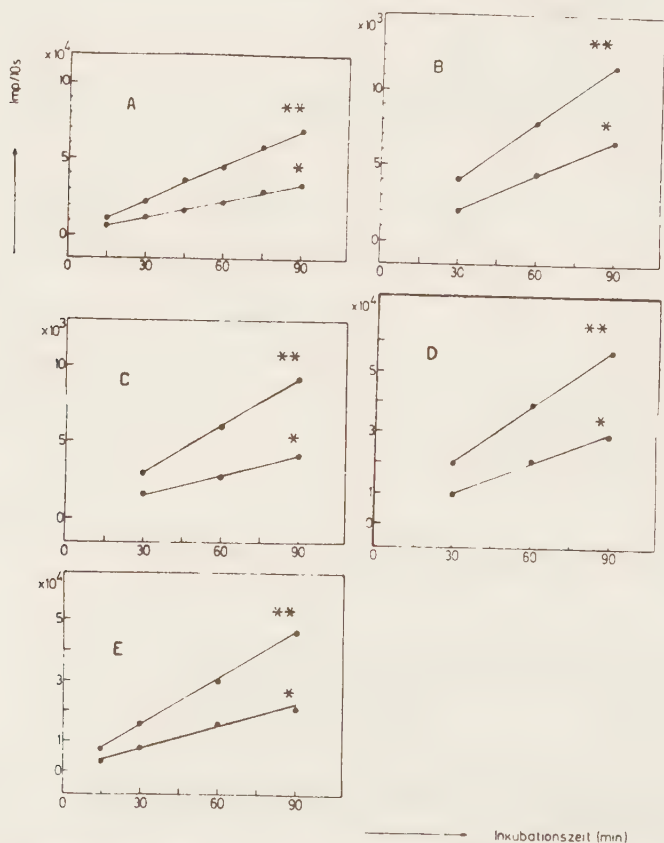


Abb. 10: Bestimmung der optimalen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen für die Detektionssysteme I bis V (A - E). *, 25°C; **, 37°C.

bei 25°C bzw. 37°C unterschiedlich lange inkubiert. Diese Versuche wurden mit allen in Tab. 2 (siehe 5.1.1.) aufgeführten Luciferin-Derivate durchgeführt (siehe Abb. 10A-10E).

5.4.3. Durchführung.

5.4.3.1. Durchführung des BEIA mit Detektionssystem I (Konjugate mit Carboxylesterase).

Unter optimierten Bedingungen wurden mit Hilfe von Detektionssystem I kompetitive Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (Bradykinin (Abb. 11) und menschliches Harnkallikrein (Abb. 12)), Sandwich-Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (HUK (Abb. 13)), sowie Titerbestimmungen (Anti-HUK-IgG (Abb. 14)) durchgeführt (methodische Details siehe 4.2.14.).

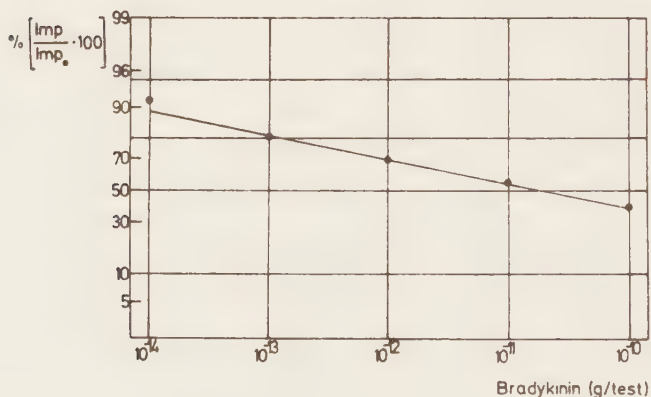


Abb. 11: Kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für Bradykinin mit Detektionssystem I.

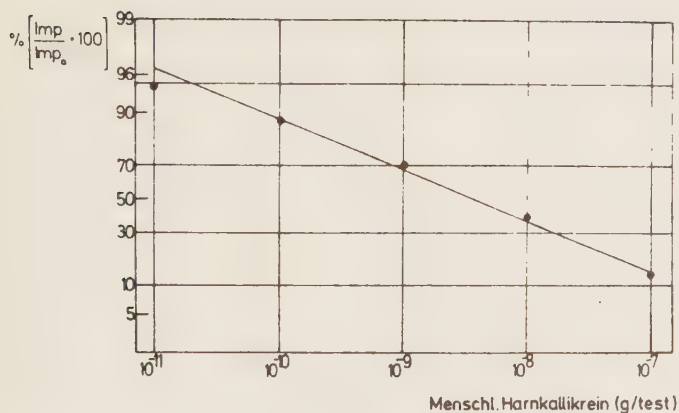


Abb. 12: Kompetitive Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein mit Detektionssystem I.

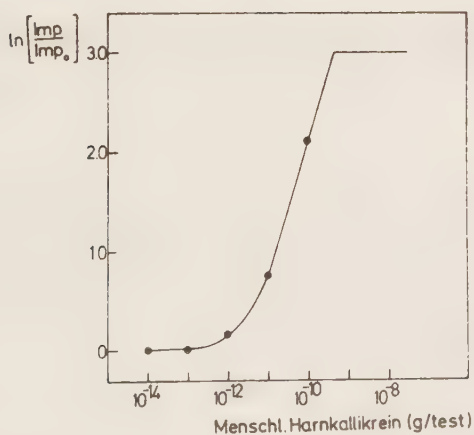


Abb. 13: Sandwich-Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein mit Detektionssystem I.

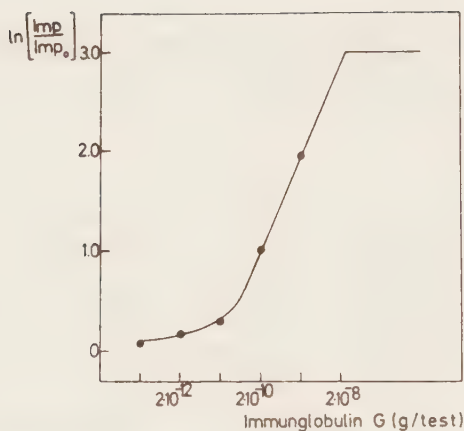


Abb. 14: Titerbestimmung von Anti-HUK-IgG mit Detektionssystem I.

5.4.3.2. Durchführung des BEIA mit Detektionssystem II (Konjugate mit Carboxypeptidase A).

Unter optimierten Bedingungen wurden mit Detektionssystem II kompetitive Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (Bradykinin (Abb. 15) und menschliches Harnkallikrein (Abb. 16)), Sandwich-Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (HUK (Abb. 17)), sowie Titerbestimmungen (Anti-HUK-IgG (Abb. 18)) durchgeführt (methodische Details siehe 4.2.14.).

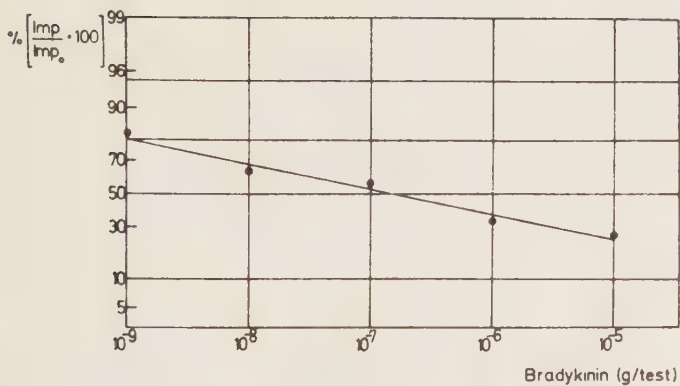


Abb. 15: Kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für Bradykinin mit Detektionssystem II.

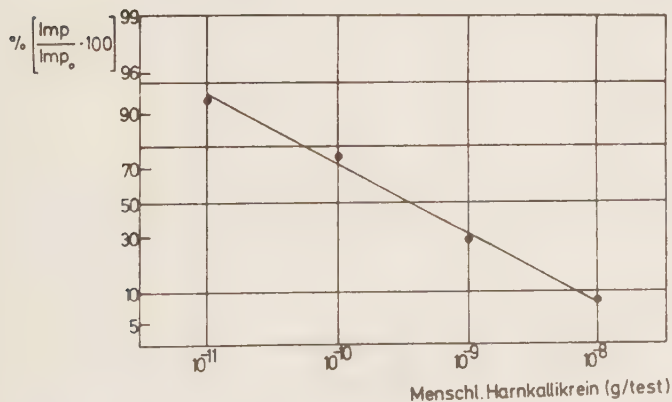


Abb. 16: Kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein mit Detektionssystem II.

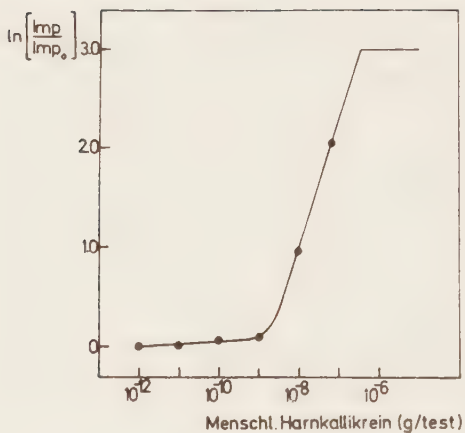


Abb. 17: Sandwich-Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein mit Detektionssystem II.

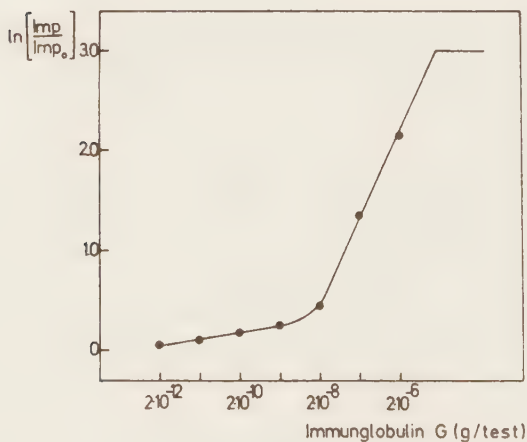


Abb. 18: Titerbestimmung von Anti-HUK-IgG mit Detektionssystem II.

5.4.3.3. Durchführung des BEIA mit Detektionssystem III (Konjugate mit Carboxypeptidase B).

Unter optimierten Bedingungen wurden mit Detektionssystem III kompetitive Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (Bradykinin (Abb. 19) und menschliches Harnkallikrein (Abb. 20)), Sandwich-Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (HUK (Abb. 21)), sowie Titerbestimmungen (Anti- HUK-IgG (Abb. 22)) durchgeführt (methodische Details siehe 4.2.14.).

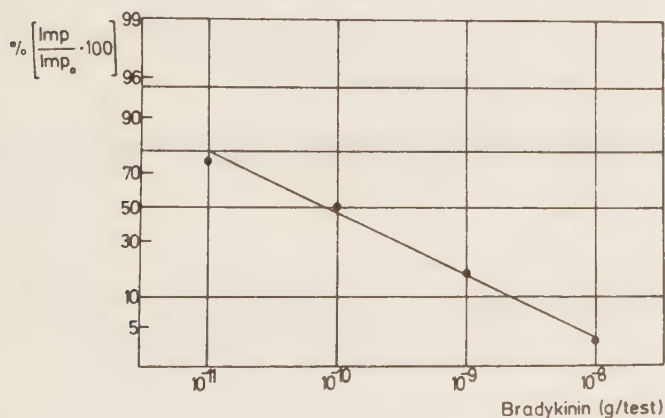


Abb. 19: Kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für Bradykinin mit Detektionssystem III.

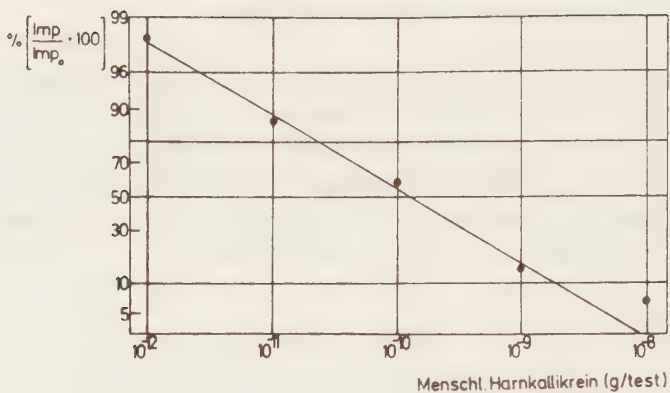


Abb. 20: Kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein mit Detektionssystem III.

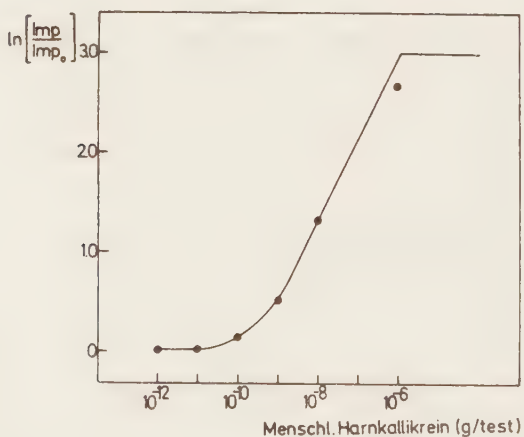


Abb. 21: Sandwich-Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein mit Detektionssystem III.

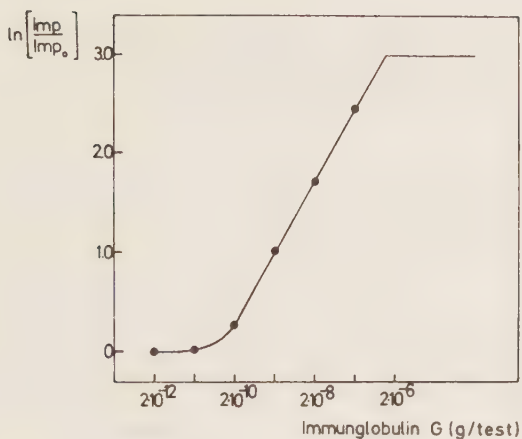


Abb. 22: Titerbestimmung von Anti-HUK-IgG mit Detektionssystem III.

5.4.3.4. Durchführung des BEIA mit Detektionssystem IV (Konjugate mit Arylsulfatase).

Unter optimierten Bedingungen wurden mittels Detektionssystem IV kompetitive Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (Bradykinin (Abb. 23), sowie Titerbestimmungen (Anti-HUK-IgG (Abb. 24)) durchgeführt (methodische Details siehe 4.2.14.).

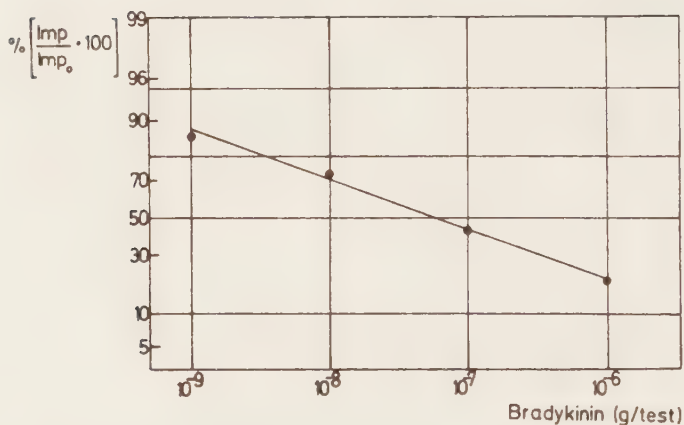


Abb. 23: Kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für Bradykinin mit Detektionssystem IV.

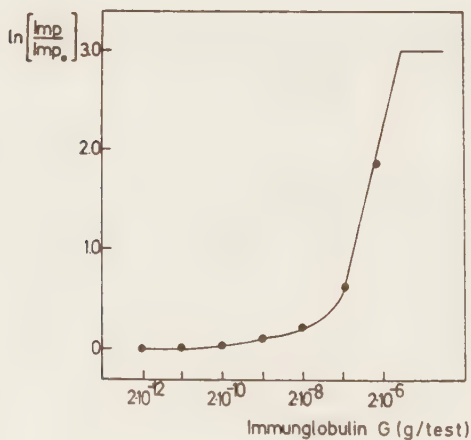


Abb. 24: Titerbestimmung von Anti-HUK-IgG mit Detektionssystem IV.

5.4.3.5. Durchführung des BEIA mit Detektionssystem V (Konjugate mit alkalischer Phosphatase).

Unter optimierten Bedingungen wurden mit Hilfe von Detektionssystem V kompetitive Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (Bradykinin (Abb. 25)), Sandwich-Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (menschliches Harnkallikrein (Abb. 26)), "indirekte" Biolumineszenz-Enzymimmunoassays (menschliches Harnkallikrein (Abb. 27), sowie Titerbestimmungen (Anti-HUK-IgG (Abb. 28)) durchgeführt (methodische Details siehe 4.2.14.).

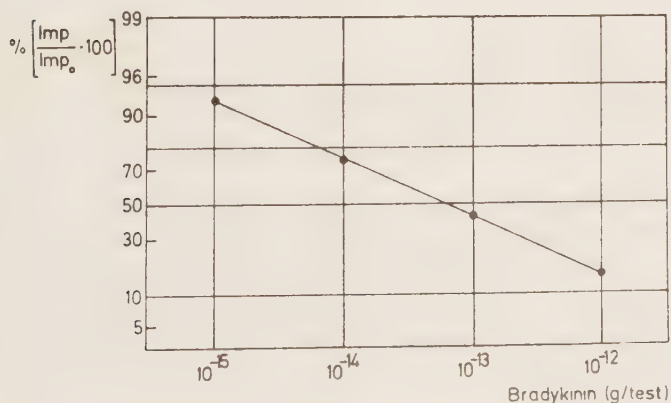


Abb. 25: Kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für Bradykinin mit Detektionssystem V.

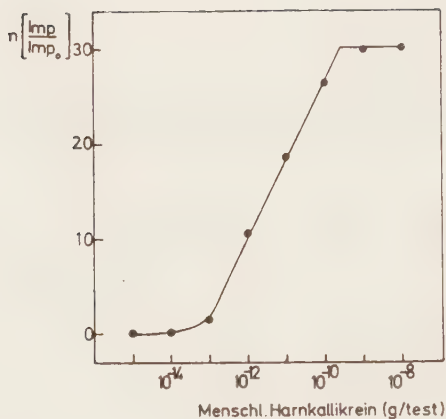


Abb. 26: Sandwich-Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein mit Detektionssystem V.

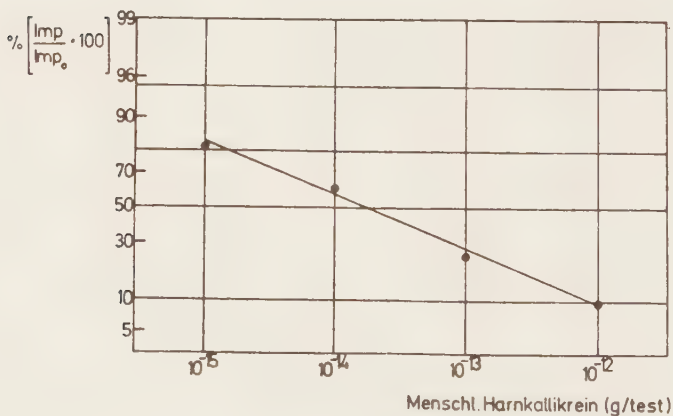


Abb. 27: Indirekter Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für menschliches Harnkallikrein mit Detektionssystem V.

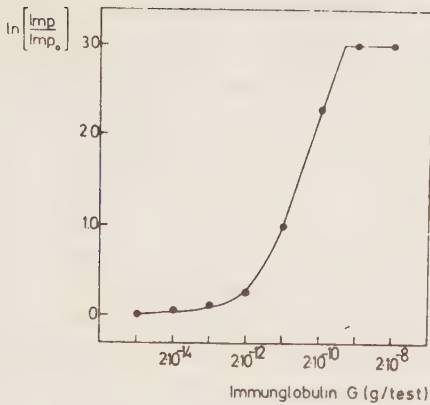


Abb. 28: Titerbestimmung von Anti-HUK-IgG mit Detektionssystem V.

5.4.4. Statistische Parameter.

Aus allen unter 5.4.3.1. bis 5.4.3.5. durchgeführten Bio-lumineszenz-Enzymimmunoassays (BEIA) wurden die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten errechnet, sowie die Nachweisgrenze (Sensitivität) des BEIAs bestimmt. Die erhaltenen Daten sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Tab. 10: Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten sowie Sensitivitäten der einzelnen Detektionssysteme.

Detektionssystem	Intraassay-Koeffizient (%)	Interassay-Koeffizient (%)	Sensitivität +) (mol)
I (Konjugate mit Carboxylesterase)	3 - 5	6 - 11	$1 \cdot 10^{-17}$
II (Konjugate mit Carboxypeptidase A)	2 - 6	7 - 12	$5 \cdot 10^{-16}$
III (Konjugate mit Carboxypeptidase B)	3 - 6	8 - 12	$1 \cdot 10^{-15}$
IV (Konjugate mit Arylsulfatase)	4 - 7	-	$1 \cdot 10^{-13}$
V (Konjugate mit alkal. Phosphatase)	2 - 4	4 - 10	$3 \cdot 10^{-20}$

+) Noch detektierbare Menge (mol) an Antigen bei einem Quotienten aus Meßwert und Blindwert von 1,1 bzw. bei einer Bindung von 90% bei kompetitiven Assays.

6. Diskussion.

Synthese der Luciferin-Derivate

Luciferin (*Photinus pyralis*, Abb.4/I) stellt eine relativ komplexe heterocyclische Verbindung dar. Die Struktur wurde von White et al. (26) aufgeklärt und durch Totalsynthese bewiesen. Luciferin ist im kristallinen Zustand bei Sauerstoff- und Lichtausschluß stabil (7). In sauren Lösungen hydrolysiert es jedoch zu D-Cystein und einem nicht näher charakterisierten Benzothiazol-Derivat. In alkalischen Lösungen wird es von Luftsauerstoff besonders in Anwesenheit von Licht leicht zu Dehydroluciferin oxidiert; dabei wird der Thiazolin-Ring im Molekül zum Thiazol dehydriert. Dehydroluciferin ist ein potenter Inhibitor der Luciferase (7).

Auf Grund dieser chemischen Labilität von Luciferin war es notwendig, möglichst schonende Umsetzungen für die Synthesen zu wählen. Des weiteren war die Reinheit der dargestellten Luciferin-Derivate besonders hinsichtlich der Luciferin-Beimischung wichtig, da selbst kleine Mengen Luciferin im Biolumineszenz-Test stören.

Die zur Synthese der Luciferin-Derivate angewandten Methoden erschienen nach eingehender theoretischer Prüfung sowie nach Vorversuchen als die geeignetsten.

Luciferin-methylester konnte nach einer bereits bekannten, schonenden Methode (25) synthetisiert werden. Hierbei wird Luciferin mit Hilfe von Diazomethan zum Methylester umgesetzt. Die Umsetzung verläuft glatt und die entstehenden Nebenprodukte (N_2 und Methanol) sind leicht zu entfernen. Jedoch verläuft die Reaktion nicht quantitativ, und geringe Mengen an Luciferin mußten durch Chromatographie an Kieselgel abgetrennt werden. Die relativ geringe Ausbeute von 69%

ist vor allem auf Verluste bei der zusätzlichen Reinigung an Kieselgel zurückzuführen.

Die beiden Aminosäuren-Derivate des Luciferins, Luciferyl-(L)-Phenylalanin und N^{α} -Luciferyl-(L)-Arginin, wurden über Luciferin-N-hydroxysuccinimidester, der durch Umsetzung von Luciferin mit Hydroxysuccinimid in Gegenwart von DCCI erhalten werden kann, dargestellt. Für die Reaktion mit L-Phenylalanin waren keine störenden Nebenprodukte zu erwarten. Die Umsetzung mit L-Arginin kann wegen des Vorhandenseins einer α -Amino- und einer Guanidino-Gruppe einerseits zum N^{α} - und andererseits zum N_{ϵ} -substituierten Arginin-Derivat führen. Wegen der stark unterschiedlichen pK-Werte der α -Amino- und der Guanidino-Gruppe kann jedoch die Reaktion des Aktivesters mit Arginin bei leicht saurem pH hauptsächlich in Richtung auf das N^{α} -Substitutionsprodukt gelenkt werden (29).

Durch vollständige Umsetzung von gereinigtem N^{α} -Luciferyl-(L)-Arginin durch Carboxypeptidase B (vgl. Tab. 5), die spezifisch nur N^{α} -acyliertes carboxylständiges Lysin, Arginin oder Ornithin freisetzt (27), konnte gezeigt werden, daß eine Peptidbindung über die α -Aminogruppe des Arginins besteht.

Beide Aminosäuren-Derivate des Luciferins wurden mittels hochauflösender Flüssigkeits-Chromatographie gereinigt. Die deutlich geringere Ausbeute von 37% für N^{α} -Luciferyl-(L)-Arginin gegenüber einer Ausbeute von 63% für Luciferyl-(L)-Phenylalanin ist vor allem auf die ungünstigeren Reaktionsbedingungen zurückzuführen.

Luciferin-O-sulfat wurde durch Umsetzung von Luciferin mit Pyridin-Schwefeltrioxid-Komplex in Pyridin dargestellt. Diese Methode schien relativ schonend zu sein, da einerseits die Reaktion im Alkalischen verläuft und somit bei Lichtausschluß nur mit einem geringen Anteil an Nebenreaktionen zu rechnen war, und andererseits die relativ hohe

Reaktivität des Reagenz eine Umsetzung bei niedriger Temperatur erlaubt. Die geringe Ausbeute von 36% nach Reinigung über HPLC ist vermutlich auf die trotz allem noch drastischen Reaktionsbedingungen zurückzuführen.

Luciferin-O-phosphat wurde mittels Umsetzung von Luciferin mit Phosphoroxychlorid dargestellt. Um die Reaktionsbedingungen möglichst schonend zu halten, wurde die Reaktion bei 0°C und unter Lichtausschluß durchgeführt. Die geringe Ausbeute von 29% - die geringste aller hier synthetisierten Luciferin-Derivate - ist wahrscheinlich auf die sehr drastischen Reaktionsbedingungen zurückzuführen.

Alle hier aufgeführten Luciferin-Derivate waren in der Dünnschichtchromatographie und in der hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie einheitlich (Abb. 5).

Charakterisierung der Luciferin-Derivate

Die dargestellten Luciferin-Derivate wurden mittels Ultraviolett-, Fluoreszenz- und Massenspektren, Biolumineszenz-Assay und Aminosäurenanalyse charakterisiert.

Die UV-Maxima der Luciferin-Derivate, die durch Modifikation der Carboxylgruppe erhalten wurden, zeigen gegenüber Luciferin nur geringe Verschiebungen von $\lambda_{\max}$. Die Luciferin-Derivate der phenolischen OH-Gruppe weisen jedoch gegenüber Luciferin einen deutlichen bathochromen Shift des längerwelligen Maximums auf. Ähnliches ist auch bei den Fluoreszenz-Spektren der Luciferin-Derivate zu beobachten.

Die Emissionsspektren von Luciferin-methylester, Luciferyl-L-Phenylalanin und N $^{\alpha}$ -Luciferyl-(L)-Arginin (Abb. 6B, C, D) zeigen gegenüber dem Luciferin (Abb. 6A) nur eine ge-

ringe Verschiebung des Maximums. Die Emissionsmaxima von Luciferin-O-sulfat bzw. Luciferin-O-phosphat (Abb. 6E, 6F) sind jedoch gegenüber Luciferin um 120 bzw. 100 nm zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben; zugleich nimmt die relative Fluoreszenz verglichen mit der von Luciferin deutlich ab. Durch die Veresterung der phenolischen OH-Gruppe in Luciferin wird die Ausbildung eines Phenolat-Ions verhindert. Dies führt zu deutlichen Änderungen der elektronischen Struktur des Moleküls, die sich in einer erheblichen Verschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima äußern.

Die MH^+ -Peaks der FAB-(Fast Atom Bombardment) Massenspektren stimmen mit den errechneten Formelgewichten der Luciferin-Derivate überein (Tab. 4).

Aus den Luciferin-Derivaten konnten durch die entsprechenden Enzyme wieder luminometrisch aktives Luciferin freigesetzt werden. Dies konnte qualitativ über Fluoreszenzspektren und quantitativ mittels Biolumineszenz-Assay gezeigt werden.

Der Vergleich der Fluoreszenzspektren der Luciferin-Derivate nach enzymatischer Spaltung mit dem Spektrum des Luciferins zeigte identische Anregungs- und Emissionsmaxima. Besonders deutlich und mit bloßem Auge verfolgbar ist die enzymatische Freisetzung von Luciferin aus Luciferin-O-sulfat bzw. Luciferin-O-phosphat. Die Farbe der Fluoreszenz der Lösungen verändert sich unter dem Einfluß der Arylsulfatase bzw. alkalischen Phosphatase von blau nach grüngelb.

Das aus Luciferin-Derivaten enzymatisch freigesetzte Luciferin konnte auch im Biolumineszenz-Assay nachgewiesen und quantifiziert werden. Damit war es möglich, die Luciferin-Gehalte der einzelnen Luciferin-Derivate zu bestimmen und mit den theoretischen Werten zu vergleichen. Die gefundenen Gehalte an Luciferin stimmen gut mit den berechneten

überein (vgl. Tab. 5). Da Luciferase (*Photinus pyralis*) nur das linksdrehende D-Isomere des Luciferins unter Lichtemission umsetzt (12), kann aus den oben genannten Versuchen gefolgert werden, daß bei den Synthesen der Luciferin-Derivate keine nennenswerte Razemisierung des D(-)-Luciferins stattgefunden hat.

Für die Aminosäuren-Derivate des Luciferins konnten durch quantitative Aminosäurenanalyse weitere Daten zur Charakterisierung gewonnen werden. Es zeigten sich auch hier gute Übereinstimmungen zwischen berechneten und gefundenen Aminosäuren-Gehalten (siehe 5.1.2.).

Auf Grund aller hier vorgestellten Ergebnisse zur Charakterisierung der dargestellten Luciferin-Derivate können die für die einzelnen Derivate angegebenen Strukturen (Abb. 4) als gesichert angesehen werden.

Eigenschaften der Luciferin-Derivate

Um die Verwendbarkeit der dargestellten Luciferin-Derivate im Detektionssystem des Enzymimmunoassay beurteilen zu können, war es notwendig zu klären, ob die Derivate Hemmstoffe oder sogar Substrate der Luciferase darstellen. Ferner mußte bestimmt werden, ob und wie gut die Derivate von den entsprechenden Enzymen umgesetzt werden. Dazu wurden die kinetischen Konstanten K_M , V_{max} , k_{cat} und k_{cat}/K_M für alle hier synthetisierten Luciferin-Derivate bestimmt.

Die fluorimetrische Bestimmung der enzymatischen Konstanten bot sich für die Luciferin-Derivate an, da zum einen sowohl Luciferin als auch die hier synthetisierten Derivate fluoreszieren und zum anderen noch sehr kleine Umsätze an Substrat gemessen werden können. K_M und V_{max} wurden nach Lineweaver-Burk (24) mittels linearer Regression ermittelt. Der Korrelationskoeffizient r^2 der erhaltenen Geraden war in allen Fällen besser als 0,995.

Die Werte der Michaelis-Menten-Konstanten (Tab. 6) bewegen

sich in den Größenordnungen, die normalerweise für diese Enzyme gefunden werden. Die k_{cat} -Werte sind außer für alkalische Phosphatase relativ klein. Die in Tab. 6 angegebenen k_{cat}/K_M -Werte variieren von $2,2 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ für Carboxypeptidase A (Substrat Luciferyl-L-Phenylalanin) bis $23.000 \text{ l}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ für alkalische Phosphatase (Substrat Luciferin-O-phosphat). Demnach erschien die alkalische Phosphatase (Substrat Luciferin-O-phosphat) von allen hier untersuchten Enzymen als das am besten geeignete, um damit ein empfindliches Detektionssystem zu entwickeln.

Die eventuelle Hemmung der Luciferase durch die dargestellten Luciferin-Derivate kann relativ einfach bioluminometrisch untersucht werden. Dabei wurde die Änderung der Lichtausbeute der Biolumineszenz-Reaktion bei verschiedenen Luciferin-Konzentrationen unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen an Luciferin-Derivaten gemessen. Außer Luciferin-methylester zeigen die hier getesteten Luciferin-Derivate bis zum 10^4 -fach molaren Überschuß an Derivat gegenüber Luciferin nur geringe bis mäßige Hemmung der Biolumineszenz-Reaktion (Tab. 7). Luciferin-methylester zeigt wahrscheinlich auf Grund seiner großen strukturellen Ähnlichkeit mit Luciferin die mit Abstand stärkste Hemmung der Luciferase. Diese ist jedoch verglichen mit anderen "echten" Hemmstoffen der Luciferase wie z.B. Dehydroluciferin (7) sehr gering, da beim 10^3 -fach molaren Überschuß (bezogen auf Luciferin) noch etwa ein Viertel der ursprünglichen Aktivität der Luciferase vorhanden ist. Wegen ihrer Spaltbarkeit durch entsprechende Enzyme und wegen ihrer nur geringen Hemmung der Luciferase erscheinen die hier untersuchten Luciferin-Derivate für die Verwendung in einem Detektionssystem als geeignet.

Darstellung von Enzym-Antigen/Antikörper-Konjugaten

Alle in der Arbeit dargestellten Enzym-Antigen- und Enzym-Antikörper-Konjugate sind in Tab. 8 aufgeführt. Konjugate mit dem Enzym Carboxylesterase wurden entweder mittels wasserlöslichem Carbodiimid (EDAPC) oder mittels Glutardialdehyd synthetisiert, da SPDPR (ein Aktivester) von der Esterase rasch gespalten wird und es somit nicht mehr zu einer Reaktion mit freien Aminogruppen des Enzyms kommt. Für die Enzyme Carboxypeptidase A und B, Arylsulfatase und alkalische Phosphatase wurde das sehr spezifisch reagierende SPDPR eingesetzt. Die Methode, die von Carlsson et al. (22) entwickelt wurde, erlaubt im Gegensatz zu Carbodimiden und Glutardialdehyd eine sehr spezifische Synthese von Protein-Protein-Konjugaten, die darüber hinaus auf jeder Stufe photometrisch kontrolliert werden kann.

Die Abtrennung niedermolekularer Reaktionsprodukte erfolgte über Gelfiltration an Sephadex G-15, G-25 und G-150. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden vereinigt. Die enzymatischen Aktivitäten der dargestellten Konjugate schwankte von 0,37 U/ml (Anti-HUK-IgG-Esterase-Konjugat) bis 220 U/ml (Anti-HUK-IgG-alkal.Phosphatase-Konjugat) (vgl. Tab. 8).

Optimierung der Detektionssysteme in Bezug auf die eingesetzten Konzentrationen an Luciferin-Derivat

Die Ergebnisse der Vorversuche (5.4.1.) zeigten, daß die Grundvoraussetzungen für die Entwicklung eines ultrasensitiven Detektionssystems basierend auf der Biolumineszenz von *Photinus pyralis* gegeben waren.

Um die optimalen Konzentrationen an Luciferin-Derivat der einzelnen Detektionssysteme zu ermitteln wurden Anti-Kanin-

chen-IgG-Enzym-Konjugate aller fünf Enzyme (siehe Abb. 9A-9E), die über Kaninchen-IgG an Mikrotiterplatten gebunden waren, mit unterschiedlichen Konzentrationen der entsprechenden Luciferin-Derivate inkubiert. Freigesetztes Luciferin wurde anschließend im Biolumineszenz-Test quantifiziert.

Zwei Faktoren beeinflussen in gegenläufiger Weise die Lichtausbeute bei unterschiedlichen Konzentrationen an Luciferin-Derivat. Zum einen nimmt mit steigender Konzentration ($\leq K_M$) an Luciferin-Derivat die Geschwindigkeit der Luciferinfreisetzung durch das entsprechende Enzym zu. Zum anderen wird die Biolumineszenz-Reaktion mit steigender Konzentration an Luciferin-Derivat zunehmend gehemmt. Darüber hinaus enthalten die Derivate trotz Reinigung über HPLC geringe Spuren Luciferin, die mit steigender Konzentration im Biolumineszenz-Test stören und somit die Empfindlichkeit des Assays verringern.

Die optimale Konzentration an Luciferin-Derivat ist dann gegeben, wenn die Sensitivität ein Maximum erreicht.

Luciferin-methylester (Abb. 9A) zeigt eine "glockenförmige" Abhängigkeit der Lichtausbeute von der eingesetzten Konzentration an Ester. Das Maximum der Lichtausbeute liegt bei $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Da die eingesetzten Konzentrationen an Methylester alle kleiner als K_M (Tab. 6) sind, sollte mit steigender Umsatzrate die Lichtausbeute im gleichen Maße zunehmen. Jedoch überwiegt die schon oben beschriebene Hemmung (Tab. 7) deutlich die Zunahme der Umsatzrate von Luciferin-methylester durch Carboxylesterase. Eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-6}$ mol/l Luciferin-methylester ist für Detektionssystem I (Konjugate mit Carboxylesterase) optimal.

Die übrigen Luciferin-Derivate (Abb. 9B-9E) zeigen, wie schon auf Grund ihrer im Vergleich zu Luciferin-methylester deutlich geringeren Hemmung der Biolumineszenz-Reaktion zu

erwarten, ein anderes Verhalten.

Die beiden Aminosäuren-Derivate des Luciferins (Abb. 9B, 9C) zeigen ab 10^{-5} mol/l einen leichten Rückgang der Lichtemission. Dieser ist auf die zunehmende Hemmung der Biolumineszenz-Reaktion durch die Derivate zurückzuführen. Die optimalen Konzentrationen für Detektionssystem II (Konjugate mit Carboxypeptidase A) und Detektionssystem III (Konjugate mit Carboxypeptidase B) sind jeweils 10^{-5} mol/l Aminosäure-Derivat.

Luciferin-O-sulfat (Abb. 9D) und Luciferin-O-phosphat (Abb. 9E) zeigen auch über ca. 10^{-5} mol/l eine Zunahme der Lichtemission. Im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-4} mol/l ist die Zunahme der Hemmung der Biolumineszenz-Reaktion durch die beiden Luciferin-Derivate geringer als die Zunahme der Umsatzraten von Arylsulfatase bzw. alkalischer Phosphatase. Jedoch wurden als optimale Konzentration sowohl für Detektionssystem IV (Konjugate mit Arylsulfatase) als auch für Detektionssystem V (Konjugate mit alkalischer Phosphatase) 10^{-5} mol/l Luciferin-O-sulfat bzw. Luciferin-O-phosphat gewählt, da mit zunehmender Konzentration an Luciferin-Derivat auch die Konzentration der "Verunreinigung" Luciferin zunimmt und dies die Empfindlichkeit des Assays verringert.

Optimierung der Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen für die einzelnen Detektionssysteme

Um die optimalen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen für die einzelnen Detektionssysteme zu ermitteln, wurden Anti-Kaninchen-IgG-Enzym-Konjugate aller fünf Enzyme, die über Kaninchen-IgG an Mikrotiterplatten gebunden waren, mit deren optimalen Konzentrationen an Luciferin-Derivat bei 25°C und 37°C unterschiedlich lange inkubiert. Freigesetztes Luciferin wurde bioluminometrisch mit Hilfe der Biolumineszenz-Reaktion quantifiziert.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10A bis 10E graphisch dargestellt.

Alle Detektionssysteme zeigen bei 25°C und 37°C bis zur Inkubationszeit von 90 min eine lineare Abhängigkeit der Lichtausbeute von der Zeit.

Für die Detektionssysteme I, II, III und IV wurden 37°C und 60 min als Inkubationsbedingungen gewählt. Für Detektionssystem V wurden 37°C und 30 min als Inkubationsbedingungen gewählt, da die damit erzielte Empfindlichkeit ausreichend war.

Durchführung des Biolumineszenz-Enzymimmunoassay (BEIA)

Verschiedene Typen von BEIA's (siehe auch Abb. 1) für unterschiedliche Antigene wurden mit allen hier beschriebenen Detektionssystemen (I-V) entwickelt.

Mit den Detektionssystemen I (Konjugate mit Carboxylesterase), II (Konjugate mit Carboxypeptidase A) und III (Konjugate mit Carboxypeptidase B) wurden BEIA's nach dem Kompetitionsprinzip für das Peptidhormon Bradykinin (Abb. 11, 15 u. 19) und für menschliches Harnkallikrein (Abb. 12, 16 u. 20) sowie BEIA's nach dem Sandwichprinzip für menschliches Harnkallikrein (Abb. 13, 17 u. 21) und Anti-HUK-IgG (Abb. 14, 18 u. 22) durchgeführt.

Mit Detektionssystem IV (Konjugate mit Arylsulfatase) wurde ein kompetitiver BEIA für Bradykinin (Abb. 23) und einer nach dem Sandwichprinzip für Anti-HUK-IgG (Abb. 24) durchgeführt.

Mit Detektionssystem V wurden ein kompetitiver Assay für Bradykinin (Abb. 25), ein indirekter BEIA für HUK (Abb. 27) sowie Assays nach dem Sandwichprinzip für HUK (Abb. 26) und Anti-HUK-IgG (Abb. 28).

Alle Detektionssysteme eigneten sich zur Quantifizierung im

Biolumineszenz-Enzymimmunoassay. Jedoch zeigten sich große Unterschiede bei den Sensitivitäten der einzelnen Systeme. Die Detektionssysteme I und V zeigten gegenüber den Systemen II, III und IV deutlich höhere Sensitivitäten.

Statistische Parameter und Sensitivität

Die Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten (vgl. Tab. 10) der BEIAs liegen im selben Bereich wie die herkömmlicher Enzymimmunoassays (2).

Die Sensitivitäten der einzelnen Detektionssysteme variieren sehr stark. Wie schon auf Grund der enzymatischen Daten (vgl. Tab. 6) zu erwarten, besitzt Detektionssystem V (Konjugate mit alkalischer Phosphatase) die höchste Sensitivität aller hier untersuchten Systeme. So können z. B. noch 10^{-15} g HUK im Test detektiert werden (siehe Abb. 27). Dies entspricht etwa der Masse von 20,000 Molekülen HUK.

Abschließende Bemerkungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein neuartiges ultrasensitives Detektionssystem für heterogene Immunoassays auszuarbeiten, wurde erreicht. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß es sich bei dem neuentwickelten Detektionssystem um ein breit anwendbares Verfahren handelt.

Fünf Detektionssysteme mit jeweils unterschiedlichen Enzym-Substrat-Paaren wurden ausgearbeitet und in insgesamt 18 verschiedenen Biolumineszenz-Enzymimmunoassays für ein Peptid und zwei unterschiedliche Proteine erfolgreich angewandt. Die erreichbaren Sensitivitäten liegen deutlich über

denjenigen der Radioimmunoassays. Vor allem Detektionssystem V (Konjugate mit alkalischer Phosphatase) erlaubt die Ausarbeitung höchst sensitiver Assays.

7. Ausblick

Das in dieser Arbeit ausgearbeitete Verfahren zur Bestimmung kleinster Mengen an Antigen in heterogenen Immunoassays ist geeignet, den Radioimmunoassay zu substituieren. Auf Grund der verwendeten Mikrotiterplatten sind Serienuntersuchungen möglich; zudem sind seit kurzem dafür geeignete Meßgeräte erhältlich.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich jedoch auch andere als die bisher diskutierten Aspekte. So sollten sich die dargestellten, aber auch andere, noch zu synthetisierenden Derivate des Luciferins dazu eignen, Enzyme sehr empfindlich zu detektieren. Möglicherweise finden solche Verbindungen Anwendung in der Enzymologie. Des weiteren erscheint eine Anwendung dieses Detektionssystems auch bei Techniken wie z. B. Western-, Southern-Blotting etc. möglich. Nach unseren Erfahrungen sollte dadurch eine Steigerung der Empfindlichkeit dieser Techniken zu erreichen sein.

8. Literaturverzeichnis

- (1) R. S. Yalow and S. A. Berson (1959): Assay of Plasma Insulin in Human Subjekts by Immunological Methods, Nature, 184, 1648
- (2) A. H. W. M. Schuurs and B. K. van Weemen (1976): Prinzip des heterogenen Enzymimmunoassays (EIA oder ELISA). In: Enzymimmunoassay, W. Vogt (Hsgr.), pp. 4-9, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- (3) R. S. Yalow (1979): Radioimmunoassay: A probe for the Fine Structure of Biologic Systems, Dt. Ges. f. Klin. Chemie e. V.-Mitteilungen, 1/79, 2-21
- (4) A. H. W. M. Schuurs and B. K. van Weemen (1979): Enzyme-Immunoassay: A Powerful Analytical Tool, Dt. Ges. f. Klin. Chemie e. V.-Mitteilungen, 1/79, 22-31
- (5) J. G. Burr (ed) (1985): Chemi- and Bioluminescence, Marcel Dekker, Inc., New York
- (6) W. D. McElroy and M. DeLuca (1985): Firefly Luminescence. In: Chemi- and Bioluminescence, J. G. Burr (ed), pp. 387-400, Marcel Dekker, Inc., New York
- (7) M. A. DeLuca (1978): Bioluminescence and Chemiluminescence, Methods Enzymol., LVII
- (8) W. W. Ward (1985): General Aspects of Bioluminescence. In: Chemi- and Bioluminescence, J. G. Burr (ed), pp. 321-358, Marcel Dekker, Inc., New York
- (9) E. H. White and E. Rapaport (1969): Chemi- and Bioluminescence of Firefly Luciferin, J. Am. Chem. Soc., 91, 2178-2180
- (10) E. H. White, M. G. Steinmetz, J. D. Miano, P. D. Wildes and R. Morland (1980): Chemi- and Bioluminescence of Firefly Luciferin, J. Am. Chem. Soc., 102, 3199-3208
- (11) J. D. Moyer and J. F. Henderson (1983): Nucleosid Triphosphate Specificity of Firefly Luciferase, Anal. Biochem., 131, 187-189
- (12) M. DeLuca (1976): Firefly Luciferase, Adv. in Enzymol., 44, 37-68

- (13) E. H. White, H. Wörther, H. H. Seliger and W. D. McElroy (1966): Amino Analogs of Firefly Luciferin and Biological Activity Thereof, *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 2015-2018
- (14) B. Strehler and J. Trotter (1954): Determination of ATP and related Compounds, *Meth. in Biochem. Analysis*, 1, 341-356
- (15) D. Slawinska and J. Slawinski (1985): Application of Bioluminescence and Low-Level Luminescence from Biological Objects. In: *Chemi- and Bioluminescence*, J. G. Burr (ed), pp. 321-358, Marcel Dekker, Inc., New York
- (16) J. Wannlund and M. DeLuca (1981): Bioluminescent Immunoassays: Use of Luciferase-Antigen Conjugates for Determination of Methotrexate and DNP. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications*, M. DeLuca and W. McElroy (eds.), pp. 693-696, Academic, New York
- (17) D. W. Reichard and R. J. Miller (1981): Bioluminescent Immunoassays: A New Enzyme-Linked Analytical Method for Quantitation of Antigens. In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Basic Chemistry and Analytical Applications*, M. DeLuca and W. McElroy (eds.), pp. 667-672, Academic, New York
- (18) G. Wattermark, H. Stymme, S. E. Brolin and B. Peterson (1975): Substrate Analysis in Single Cells: I. Determination of ATP, *Anal. Biochem.*, 63, 293-307
- (19) J. M. Schaeffer and A. J. W. Hsueh (1984): Bungarotoxin-Luciferin As a Bioluminescent Probe for Characterization of Acetylcholine Receptors in the Central Nervous System, *J. Biol. Chem.*, 259, 2055-2058
- (20) M. Steinbuch (1969): The Isolation of IgG From Mammalian Sera with the Aid of Caprylic Acid, *Arch. Biochem. Biophys.*, 134, 279-284
- (21) *Biochemica Information* (1973) herausgegeben von Boehringer Mannheim GmbH Pfs. 51, 68 Mannheim 31
- (22) J. Carlsson, H. Drevin and R. Axén (1978): Protein Thiolation and Reversible Protein-Protein Conjugation, *Biochem. J.*, 173, 723-737

- (23) M. M. Bradford (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254
- (24) H. Lineweaver and D. Burk (1934), *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658
- (25) E. H. White and H. Wörther (1966): Analogs of Firefly Luciferin, *J. Org. Chem.*, 31, 1484-1488
- (26) E. H. White, F. McCapra and G. F. Field (1963): The Structure and Synthesis of Firefly Luciferin, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 337-343
- (27) G. E. Perlman and L. Lorand (1970): Proteolytic Enzymes, *Methods Enzymol.*, XIX
- (28) J. Ziegenhorn, M. Senn and T. Bücher (1976): Molar Absorptivities of β -NADH and β -NADPH, *Clin. Chem.*, 22, 151-160
- (29) K. Lübke, E. Schröder und G. Kloss (1975): *Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine I*, Georg Thieme Verlag Stuttgart

Abkürzungen

AcPheArgOEt	N-Acetyl-L-phenylalanyl-L-arginin-ethylester
ADP	<u>A</u> denosin-5'- <u>d</u> iphosphat
AMP	<u>A</u> denosin-5'- <u>m</u> onophosphat
ATP	<u>A</u> denosin-5'- <u>t</u> riphosphat
BEIA	<u>B</u> iolumineszenz- <u>E</u> nzym <u>i</u> mmuno <u>a</u> ssay
CNBr	Cyanbromid
DC	<u>D</u> ünnschicht <u>c</u> hromatographie
DCCI	<u>D</u> icyclohexyl <u>c</u> arbodi <u>i</u> mid
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreit <u>o</u> l
EDAPC	N- <u>E</u> thyl-N'-(3- <u>D</u> iethyl <u>a</u> minopropyl)- <u>c</u> arbodiimid- hydrochlorid
EIA	<u>E</u> nzym <u>i</u> mmuno <u>a</u> ssay
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay
FMNH ₂	<u>F</u> lavin- <u>M</u> ononucleotid reduziert
FPLC	<u>F</u> ast <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
GDA	<u>G</u> lutardialdehyd
HEPES	2-(4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)-1- <u>p</u> iperazinyl)- <u>e</u> than- <u>s</u> ulfonsäure
HPLC	<u>H</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
HUK	<u>H</u> uman <u>u</u> rinary <u>k</u> allikrein
IgG	<u>I</u> mmunglobulin Fraktion <u>G</u>
Luciferin	D(-)-2-(6'- <u>H</u> ydroxy-2'- <u>B</u> enzothiazolyl)- Δ^2 -Thiazolin-4-Carbonsäure
NAD	<u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inucleotid
NADH	<u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inucleotid reduziert
NADP	<u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inucleotidphosphat
NADPH	<u>N</u> icotinamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inucleotidphosphat reduziert
RIA	<u>R</u> adio <u>i</u> mmuno <u>a</u> ssay
SPDPR	N- <u>s</u> uccinimidyl-3-(2- <u>p</u> yridyl- <u>d</u> ithio)propionate
Tris	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U	<u>U</u> nit(s) (Umsatz von 1 umol Substrat pro Minute) 1U = 16,7 nkatal

Danksagungen

Herrn Professor Dr. H. Fritz möchte ich herzlich dafür danken, daß ich an seinem Institut und mit seiner hilfreichen Unterstützung die vorliegende Arbeit anfertigen konnte, nicht zuletzt durch die Bereitstellung von Laborräumen und technischen Geräten.

Meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Geiger möchte ich für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas und der stets tatkräftigen Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit ganz besonders danken. Sein großes Interesse und seine wissenschaftliche Begeisterung haben stets befruchtend und stimulierend auf meine Arbeiten gewirkt.

Herrn Dr. F. Kovac, Universität Ljubljana möchte ich für die Durchführung der Elementaranalysen und die Anfertigung der FAB-Massenspektren danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Müller-Esterl, Herrn Dr. F. Fiedler und Herrn Dr. W. Gebhard für die freundliche Unterstützung mit technischen Geräten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Frau D. Lamers, Frau M. Arnhold, Frau S. Sokal, Frau P. Hauzenberger sowie Herrn R. Nettelbeck, Herrn G. Trefz und Herrn A. Elwakiel, die durch tatkräftige Unterstützung und eine freundschaftliche Atmosphäre sehr zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Gisela für ihr großes Verständnis, ihre Geduld und liebevolle Hilfe sowie für anregende Diskussionen ganz besonders danken.

Lebenslauf

- 21.12.1954 Geboren als Sohn von Heinz Miska und Maria,
geb. Pissarek
- 1961 - 1966 Besuch der Grundschule in Teisnach
- 1966 - 1976 Gymnasium Zwiesel, Abitur: Juni 1976
- 1976 - 1978 Studium der Chemie an der Universität
Regensburg, Vordiplom: Aug. 1978
- 1979 - 1982 Hauptstudium an der Ludwigs-Maximilians-
Universität München, Diplom: Juni 1982
- 1982 - 1983 Tätigkeit bei der Firma ECOTEC (Institut für
Forschung und Beratung) München
- 1983 - 1984 Beginn der Dissertation bei
Priv.-Doz. Dr. R. Geiger am
Max-Planck-Institut für Biochemie in
Martinsried bei München, Abteilung für
Peptidchemie (Leitung: Prof.Dr. E. Wünsch)
- 1984 - 1986 Fertigstellung der Dissertation unter Leitung
von Priv.-Doz. Dr. R. Geiger an der Abteilung
für Klinische Chemie und Biochemie
an der Universität München
(Leitung: Prof. Dr. H. Fritz)

